



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE DE METZ

**CENTRE DES SCIENCES
DE L'ENVIRONNEMENT**

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE METZ

SPECIALITE : TOXICOLOGIE DE L'ENVIRONNEMENT

***ETUDE DE BIOCAPTEURS A ALGUES IMMOBILISEES
POUR LE CONTROLE DES MILIEUX HYDRIQUES***

Soutenue le 25 MARS 1992

par

Pascal PANDARD

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE - METZ	
N° inv.	1992.0545
Cote	S/M3 32/13
Loc	Magasin

Membres du jury :

***P. VASSEUR, Président
D. BURNEL, Rapporteur
F. COLIN, Rapporteur
J.F. FERARD
J.F. GONNET
S. MULLER***

Mademoiselle P. VASSEUR a été l'instigatrice de ce travail. Par l'étendue de ses connaissances et par ses conseils avisés, elle m'a permis de mener à bien cette étude ; qu'elle trouve ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.

Je suis particulièrement sensible à la présence dans le jury de Monsieur D. BURNEL, je lui exprime, dans ces quelques lignes, toute ma reconnaissance pour avoir accepté de juger ce travail.

J'exprime ma gratitude à Monsieur J.F. FERARD pour les précieux conseils qu'il m'a amicalement prodigués et pour l'intérêt qu'il a manifesté pour cette étude.

Mes remerciements s'adressent aussi à Monsieur F. COLIN qui me fait le plaisir d'être rapporteur de cette thèse et à Messieurs S. MULLER et J.F. GONNET qui ont accepté de siéger dans mon jury.

Je remercie la Région Lorraine, la société Aspect Service Environnement, le Ministère de l'Environnement et la Fondation Européenne pour la Science pour leur soutien financier au cours de ce travail.

Je ne saurais oublier Monsieur D.M. RAWSON et son équipe qui m'ont réservé un accueil chaleureux dans leur laboratoire et m'ont fait bénéficier de leurs connaissances approfondies dans le domaine des biocapteurs.

SOMMAIRE

<u>INTRODUCTION</u>	1
<u>1. LES BIOCAPTEURS</u>	4
<u>1.1 Définition</u>	5
<u>1.2 Réactif biologique</u>	8
1.2.1 Techniques d'immobilisation	8
1.2.2 Choix du réactif biologique	10
<u>1.3 Applications des biodétecteurs</u>	11
1.3.1 Domaine médical	11
1.3.2 Domaine alimentaire et de la nutrition	12
1.3.3 Contrôle des fermentations et des bioréacteurs industriels	12
1.3.4 Contrôle de la qualité de l'Environnement et biocapteurs appliqués aux contrôles de toxicité	13
<u>2. REACTIF BIOLOGIQUE : LES ALGUES</u>	17
<u>2.1 Activité photosynthétique</u>	18
2.1.1 Rappels sur la photosynthèse	18
2.1.2 Appareil photosynthétique	18
2.1.3 Cycle d'oxydation de l'eau	20
<u>2.2 Intérêt des algues unicellulaires pour l'évaluation de la toxicité des milieux aquatiques</u>	23
2.2.1 Critères de la toxicité sur algues	24
2.2.1.1 Estimation de la biomasse algale	26
2.2.1.2 Mesure de l'activité photosynthétique	29
2.2.1.3 Mesure des activités biochimiques fonctionnelles	30
2.2.1.4 Cytométrie de flux	31
2.2.2 Tests normalisés d'inhibition de croissance	32
<u>2.3 Utilisation des algues en biotechnologie</u>	34
<u>3. DEVELOPPEMENT DE CAPTEURS A ALGUES IMMOBILISEES</u>	37
<u>3.1 Système de mesure du flux électronique</u>	38
3.1.1 Appareillage utilisé	41
3.1.1.1 Cellule électrochimique	41
3.1.1.2 Electrode de graphite	43
3.1.1.3 Electrode Ag/AgCl	44
3.1.2 Réactif biologique	44

3.1.3 Immobilisation du biocatalyseur	45
3.1.3.1 Adsorption sur membrane	45
3.1.3.2 Inclusion dans un gel d'alginate	45
<u>3.2 Electrode à oxygène</u>	47
3.2.1 Principe de la mesure	48
3.2.2 Appareillage	50
3.2.3 Membrane protectrice, électrolyte	51
3.2.4 Réactif biologique, Immobilisation	51
<u>3.3 Expression des résultats</u>	52
<u>3.4 Tests algues</u>	52
<u>4. RESULTATS : SYSTEME A MEDiateur</u>	53
<u>4.1 Optimisation du système</u>	54
4.1.1 Choix du médiateur	54
4.1.2 Propriétés de la p-benzoquinone	57
4.1.2.1 Propriétés chimiques	57
4.1.2.2 Toxicité	58
4.1.3 Durée de vie du biocapteur	58
<u>4.2 Sensibilité du système</u>	62
4.2.1 Toxicité des herbicides	62
4.2.1.1 Biocapteur immobilisé par adsorption sur membrane	62
4.2.1.2 Biocatalyseur inclus dans un gel d'alginate	64
4.2.2 Toxicité des métaux	66
<u>4.3 Conclusions concernant les essais avec médiateurs</u>	67
<u>5. RESULTATS : BIOCAPTEUR A OXYGENE</u>	68
<u>5.1 Optimisation du système</u>	69
5.1.1 Paramètres physiques du système	69
5.1.1.1 Potentiel imposé	69
5.1.1.2 Choix de l'électrolyte	70
5.1.1.3 Influence de la membrane protectrice	71
5.1.2 Améliorations apportées au système	75
5.1.2.1 Choix du support de fixation des micro-organismes	75
5.1.2.2 Influence de l'âge de la culture sur la sensibilité des électrodes	77
5.1.2.3 Influence de la concentration algale sur la sensibilité vis-à-vis des toxiques	79
5.1.3 Durée de vie du capteur	84
5.1.4 Conclusions sur les essais d'optimisation du système	84

<u>5.2 Sensibilité du système</u>	87
5.2.1 Toxicité des substances chimiques	87
5.2.1.1 Toxicité des herbicides	87
5.2.1.2 Toxicité des métaux	92
5.2.1.3 Autres substances chimiques	96
5.2.2 Application des bioélectrodes à des effluents industriels	98
5.2.2.1 Réactif biologique <i>Scenedesmus subspicatus</i>	98
5.2.2.2 Réactif biologique <i>Chlorella vulgaris</i>	103
<u>5.3 Applications à un environnement marin</u>	108
 <u>6. CONSERVATION DES ALGUES A LONG TERME</u>	109
<u>6.1 Electrodes prêtes à l'emploi</u>	113
<u>6.2 Cultures liquides</u>	115
6.2.1 Etudes de sensibilité	115
6.2.2 Stabilité de la réponse	120
6.2.3 Etudes microscopiques	121
 <u>7. DISCUSSION</u>	123
<u>7.1 Spectre d'applicabilité des bioélectrodes algales</u>	124
<u>7.2 Comparaison et intérêt des systèmes développés</u>	126
<u>7.3 Application <i>in situ</i> du biocapteur à oxygène</u>	133
7.3.1 Influence de la configuration du capteur	133
7.3.2 Contraintes liées à l'utilisation d'un réactif biologique	134
 <u>8. CONCLUSION</u>	136
 <u>9. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u>	139
 <u>ANNEXES</u>	153
Annexe 1	154
Annexe 2	156
Annexe 3	157
Annexe 4	162
Annexe 5	163
Annexe 6	164

INTRODUCTION

La menace croissante d'une contamination des eaux par des micropolluants d'origine industrielle ou agricole a fait prendre conscience de la nécessité de mettre en place des systèmes de contrôle en continu et *in situ* des sources de pollution.

De tels systèmes sont pratiquement inexistants ; ils commencent seulement à se développer dans le domaine des eaux potables avec l'automatisation du test Microtox pour le contrôle des eaux destinées à la potabilisation et l'utilisation du truitomètre pour évaluer la qualité des eaux d'alimentation.

L'approche actuelle de l'évaluation de la qualité des eaux reste encore limitée au stade du laboratoire. Elle implique le prélèvement des échantillons à analyser et dans la majorité des cas, un prétraitement avant d'en évaluer la toxicité sur organismes cellulaires, vertébrés ou invertébrés. Les résultats sont donc différés par rapport au prélèvement. Ces conditions éliminent toute possibilité d'intervention si l'effluent présente une toxicité : ce dernier a rejoint depuis longtemps le milieu naturel lorsque la réponse des tests est connue.

Le recours à des systèmes miniaturisés utilisant des organismes cellulaires immobilisés au contact d'un détecteur physique ou électrochimique permettrait de répondre de manière satisfaisante à cette demande de contrôles *in situ*.

L'association étroite matériel biologique - détecteur, spécifique des biocapteurs, permet d'obtenir une réponse de l'appareil en temps réel et donc d'envisager la mise en place de systèmes contrôlant la toxicité *in situ* avec un recueil d'informations en continu. La rapidité de réponse de ces bioélectrodes rend possible leur utilisation en tant que systèmes d'alerte pour la prévention des risques de pollution accidentelle en cas de rejets anormalement élevés. Ces systèmes d'alerte permettront d'agir vite, d'interrompre l'évacuation du flux toxique en le détournant vers un bassin de rétention et ainsi de retraiter l'effluent.

Notre travail concerne le développement d'un biocapteur à algues immobilisées sur une membrane pour le contrôle de toxicité des eaux. Nous avons étudié dans un premier temps la faisabilité et la sensibilité d'un système de configuration très simple, applicable au laboratoire et permettant de mesurer l'activité photosynthétique d'algues unicellulaires utilisées comme indicateur de l'impact des polluants hydriques. Deux phénomènes traduisant l'activité photosynthétique consécutive à une excitation lumineuse, ont été étudiés et appliqués à la réalisation de biocapteurs : émission d'un flux d'électrons et production d'oxygène.

Ces essais ont permis de définir le type de bioélectrodes le mieux adapté au contrôle de toxicité des eaux.

Nous nous sommes attachés dans une deuxième étape à éprouver la fiabilité et l'intérêt de ce système et à comparer ses performances à celle des méthodes d'essais conventionnelles développées au laboratoire.

CHAPITRE 1

LES BIOCAPTEURS

- **Définition**
- **Réactif biologique**
- **Application des biodétecteurs**

1.1 Définition

Un biocapteur peut se définir comme un appareil analytique comprenant une composante biologique sensible étroitement associée ou intégrée à un détecteur physique ou électrochimique appelé TRANSDUCTEUR. Cet appareil va répondre à la présence d'un composé chimique ou d'une série de composés et traduire rapidement sa concentration en un signal électrique ou digital (OWEN et TURNER, 1987).

La composante biologique ou BIOCATALYSEUR va reconnaître le composé à détecter avec une spécificité et une sensibilité qui caractériseront les performances du biocapteur (LOWE, 1985). Le biocatalyseur et le transducteur doivent être en contact étroit pour produire une réponse rapide et plus sensible. Une immobilisation du biocatalyseur sur le transducteur constitue le moyen le plus efficace pour associer ces deux éléments.

La réaction entre l'élément biologique et le composé à détecter peut être mesurée en suivant la production ou la consommation d'un des éléments de la réaction chimique résultante tel que : O_2 , NH_4 , H_2O_2 . Elle peut également entraîner un changement de couleur, l'utilisation d'un cofacteur (NAD, ATP ...), la production ou la consommation de chaleur ou le transfert d'électrons d'une réaction d'oxydo-réduction (Mc CANN, 1987). Cet événement va être transcrit en un signal par le transducteur. Cette transformation permet d'enregistrer et de quantifier aisément la réponse obtenue (Cf figure 1).

L'origine des biodétecteurs remonte à 1962 lorsque CLARK et LYONS ont proposé l'immobilisation d'enzymes à l'extrémité d'une électrode à oxygène. Ce premier système a été mis au point pour le suivi du changement de la pression partielle d'oxygène dans le sang résultant de l'oxydation catalytique du glucose par la glucose oxydase.

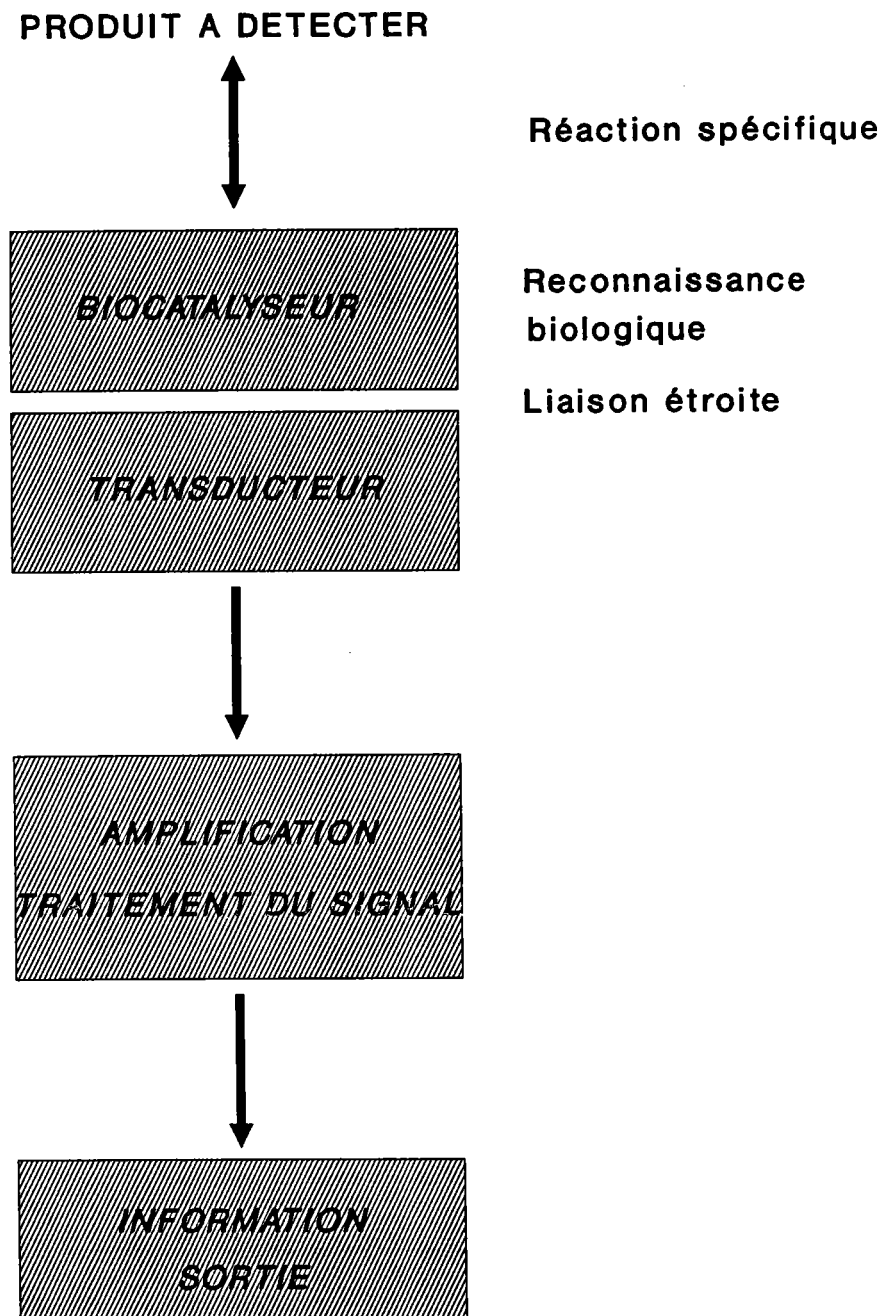


Figure 1 : Schéma général d'un biocapteur (d'après HIGGINS et LOWE, 1987 ; SCHMID et KARUBE, 1988).

Depuis ce premier détecteur de nombreux travaux ont été publiés proposant des associations variées entre biocatalyseurs et transducteurs. Le tableau I résume les principales composantes pouvant être utilisées pour construire un biocapteur.

Tableau I : Principaux éléments pouvant être utilisés pour la fabrication d'un biocapteur (d'après TURNER et al., 1987 et COUGHLAN et al., 1988).

Eléments biologiques	Transducteurs
micro-organismes (bactéries, algues) tissu cellulaire (animal, végétal) cellule organites cellulaires membranes enzymes anticorps récepteurs antigènes acides nucléiques	Electrochimiques: <u>potentiométriques</u> (électrodes spécifiques NH_3 , CO_2 , pH, F^- , F.E.T., I.S.F.E.T) <u>ampérométriques</u> (électrodes à O_2 , métalliques, systèmes à médiateurs) Optiques: (fibres optiques, photodiodes) Calorimétriques: (thermistance, calorimètre) Mécaniques: (mesure de changement de masse, cristal piézo-électrique)

Au regard des travaux publiés, l'utilisation d'une détection électrochimique (potentiométrique ou ampérométrique) reste actuellement prédominante pour la réalisation de biocapteurs. Mais les capteurs optiques se développent rapidement du fait des progrès récents dans la technologie des fibres optiques ; le domaine d'application de tels transducteurs ou optrodes est vaste puisque ces éléments permettent de quantifier des réactions bioluminescentes, chimiluminescentes ou mesurer une émission fluorescente. Ainsi TRETTNAK et WOLFBEIS (1989) ont proposé un capteur permettant la mesure du lactate en immobilisant une enzyme, la lactate monooxygénase, à l'extrémité de fibres optiques. La réaction enzyme-substrat entraîne une consommation d'oxygène qui est quantifiée par une modification de la fluorescence d'une substance colorée, maintenue au contact du biocatalyseur et sensible aux variations de la pression partielle en oxygène.

1.2 Réactif biologique

1.2.1 Techniques d'immobilisation

Pour qu'un biodétecteur se révèle sensible et réponde très rapidement, il faut maintenir la composante biologique au contact du transducteur. Cette association doit être réalisée de manière à ne pas entraver l'interaction biocatalyseur-produit à détecter (COUGHLAN et al., 1988). Plusieurs méthodes d'immobilisation, conformes à ces exigences, ont été développées. Le choix de la méthode dépend surtout de la nature du matériel biologique à immobiliser. Il convient néanmoins de prendre en compte le type de transducteur et l'environnement dans lequel le biocapteur va être appelé à fonctionner.

Il existe quatre techniques principales d'immobilisation (KENNEDY et CABRAL, 1983) :

l'absorption, technique la plus simple qui met en jeu uniquement des interactions de faible énergie entre le support et le biocatalyseur ; il s'agit d'un simple phénomène d'attraction physique,

le couplage covalent (ou covalent-binding) qui lie de manière quasiment irréversible le matériel biologique sur un support préalablement activé (création de liaison directe de nature chimique). On distingue 2 principaux types de supports selon leur nature, inorganiques (verre, quartz, céramique, alumine...) et organiques (nylon, collagène, ...),

la réticulation (ou cross linking) qui met en jeu des réactifs bifonctionnels type glutaraldéhyde,

l'inclusion dans un gel ou entrapment (alginate, polyacrylamide).

Ces techniques, mises au point initialement pour l'immobilisation des enzymes, ont été appliquées par la suite à la fixation des cellules.

L'adsorption et l'inclusion sont les procédés les plus utilisés pour l'immobilisation des cellules car ces techniques sont moins agressives que le couplage covalent ou la réticulation qui mettent en jeu des agents très réactifs capables de modifier l'intégrité de la cellule et donc de compromettre la viabilité cellulaire.

Compte tenu de l'application particulière de ces bioélectrodes algales à la mesure globale de la toxicité des eaux, la technique d'inclusion du biocatalyseur dans des gels ne semble pas appropriée. En effet, le gel va créer une barrière supplémentaire au transfert de masse entre la cellule et l'environnement liquide externe. Ainsi, HARPER (1986) a montré que l'immobilisation de *Chlorella* dans l'alginate (polymannuronate) protégeait les cellules de la toxicité des micropolluants métalliques. Le gel, riche en groupement polaires (hydroxyles et carboxyles), va fixer les cations métalliques, faire obstacle à leur pénétration et à leur diffusion jusqu'aux organismes biologiques.

Des travaux réalisés par THARREAU (1990) sur la biosorption du cadmium par des algues dans l'alginate indiquent que la fixation du cadmium par ces billes d'alginate est très élevée ; ces essais n'ont pas montré de modification de capacité d'adsorption entre les billes témoins et les billesensemencées par des cellules algales. Ceci confirme que le gel, de par sa nature, limite la diffusion du cadmium à l'intérieur des billes et le contact du métal avec les algues.

Cette méthode d'immobilisation des algues dans des gels est plus particulièrement utilisée pour la production de différents métabolites. Ainsi, MUSGRAVE et al. (1982) ont immobilisé *Anabaena* (cyanobactérie) pour produire de l'ammoniaque. De même GRIZEAU et NAVARRO (1986) ont obtenu une production de glycérol à partir de *Dunaliella tertiolecta* immobilisée dans l'alginate.

Seule la technique d'immobilisation des algues unicellulaires par adsorption semble applicable à la réalisation de biocapteurs utilisant des cellules entières. Les travaux concernant les biodétecteurs appliqués à la mesure des toxiques reprennent ce procédé d'immobilisation. Ainsi, KARUBE et al. (1981) ont réalisé une électrode dont le biocatalyseur *Bacillus subtilis* est immobilisé par filtration sur une membrane d'acétate de

cellulose poreuse pour l'évaluation de la mutagénicité des composés chimiques.

L'électrode mise au point par DORWARD et BARISAS (1984) pour la mesure des micropolluants métalliques utilise comme matériel biologique *Escherichia coli* maintenu au contact du transducteur par filtration sur membrane nucléopore (porosité 0,45 μm).

De même RAWSON et collaborateurs (1987) ont appliqué une technique identique de fixation des cyanophycées pour leur système de détection des herbicides dans les eaux destinées à la potabilisation.

1.2.2 Choix du réactif biologique

Dans le cadre du contrôle toxicologique, le choix du réactif biologique va être fonction du rôle que l'on va attribuer au capteur : détection spécifique ou globale des micropolluants. Des macromolécules, comme des enzymes ou des anticorps, seront des biocatalyseurs s'appliquant particulièrement à la recherche d'une classe définie de polluants : mise en évidence, par exemple, des composés organophosphorés ou des carbamates par inhibition de la cholinestérase (WOLFBEIS et KOLLER, 1989).

Les biodétecteurs cellulaires sont moins spécifiques que les électrodes à enzymes mais présentent un spectre de sensibilité beaucoup plus large : propriété indispensable pour évaluer la toxicité d'un effluent multicomposite.

Ces biocapteurs cellulaires constituent, en effet, des systèmes intégrant un ensemble de réactions métaboliques contrairement aux électrodes à enzymes spécifiques d'un schéma réactionnel.

Ils présentent un degré important de stabilité et sont des unités autonomes confinant leur système métabolique dans un environnement protégé (RAWSON, 1988).

La préparation des réactifs cellulaires est peu onéreuse comparée à celle des enzymes dont le coût d'extraction et de purification est élevé (FREW et HILL, 1987).

En revanche, leur temps de réponse est en général plus long : la paroi et les membranes cellulaires constituent des barrières supplémentaires entre le composé à analyser et les systèmes réactifs intracellulaires. Mais en réduisant le biocatalyseur à une couche monocellulaire, il est possible de minimiser cet inconvénient (RAWSON, 1988).

1.3 Applications des biodétecteurs

Cette technique des biocapteurs a connu un essor très important durant les années 80. COUGHLAN et collaborateurs (1988) ont dénombré plus de 750 publications entre 1980 et 1986 décrivant des biocapteurs et très souvent une association biocatalyseur-transducteur spécifique d'un produit non détecté par cette technique précédemment.

1.3.1 Domaine médical

Les recherches concernant les biocapteurs se sont orientées principalement vers le domaine pharmaceutique et médical. De nombreux détecteurs sont capables d'effectuer la mesure du glucose sanguin, des carbohydrates ainsi que la concentration en métabolites, hormones, drogues dans le sang ou dans les urines.

Des capteurs à glucose, sucrose, lactose, maltose, galactose, urée, créatinine, acide urique, ascorbate, alcool ou aspartate sont commercialement disponibles (Yellow Spring Instrument Co, Fuji Electronic, Provesta et Fiatron, Tacussel...).

Des enzymes associées à des détecteurs de type électrochimique : sondes à O_2 , H_2O_2 , NH_3 ou CO_2 , constituent la structure de ces analyseurs (GUILBAULT et LUONG, 1989). Il n'existe pas actuellement, au stade commercial, de capteurs intégrant des transducteurs de technologie plus récente comme des détecteurs à fibres optiques ou à cristaux piézo-électriques.

CAMPANELLA et TOMASSETTI (1989) ont recensé des bioélectrodes permettant la détermination de la pénicilline, du cholestérol, de l'acide acétique et de la lysine. Ces mêmes auteurs ont mis au point des systèmes détectant l'acide oxalique dans les urines ainsi que le plomb dans la bile.

Dans le domaine médical, le besoin se fait de plus en plus grand de développer des biocapteurs encore plus performant au plan spécificité, sensibilité et stabilité. Les recherches à court terme sont axées vers la mise au point de capteurs mesurant *in vivo* la quantité de métabolites présents notamment la quantité de glucose chez les diabétiques (THEVENOT et REACH, 1988).

1.3.2 Domaine alimentaire et de la nutrition

Les techniques de détection du glucose ont été adaptées et utilisées pour mesurer la teneur de ce composé dans les produits alimentaires : boissons, miels, ketchups ou confitures (LE MARREC ET LESGARDS, 1990).

D'autres axes de développement ont fait l'objet de recherches en agro-alimentaire et en nutrition : mesure de la teneur en vitamines, acides aminés, agents microbiens.

L'évaluation de la teneur en éthanol de boissons à faible degré d'alcool ou sans alcool est un exemple d'application spécifique de la technique des biocapteurs (COUGHLAN et al., 1988). Il existe également des applications potentielles pour la mesure des agents colorants, émulsifiants, agents de saveur ou agents préservatifs (conservateurs, antioxydants, antimicrobiens) dans les aliments.

La teneur en triméthylamine, hypoxanthine et inosine sont des indicateurs de la fraîcheur du poisson qui ont été mis à profit pour la réalisation de biocapteurs (WATANABE et al., 1984). Plus récemment la firme Oriental Electric a commercialisé un capteur pour évaluer la fraîcheur du poisson en suivant l'évolution du métabolisme de la purine par l'intermédiaire d'une électrode à oxygène.

1.3.3 Contrôle des fermentations et des bioréacteurs industriels

Les biocapteurs trouvent également des applications au niveau des bioréacteurs pour le contrôle des fermentations. Les possibilités de mesure en continu de paramètres tels que : évaluation de la masse cellulaire, consommation de la matière carbonée ou azotée et mesure des produits de fermentation permettent de contrôler de manière plus satisfaisante et d'optimiser l'évolution des réactions dans les fermenteurs. Ainsi *Escherichia coli* immobilisée au contact d'une électrode potentiométrique est utilisée pour suivre l'évolution de la fermentation en contrôlant la teneur en acide glutamique (RIEDEL et al. 1989).

1.3.4 Contrôle de la qualité de l'Environnement et biocapteurs appliqués aux contrôles de toxicité

SCHMID et KARUBE (1988) ont répertorié 3 axes principaux de développement des biocapteurs dans le domaine de l'environnement :

- détection de polluants couramment retrouvés dans l'environnement tel que nitrates, phosphates....
- le suivi de paramètres globaux comme la demande biochimique en oxygène pour mesurer la charge en matière organique.
- l'évaluation du caractère toxique ou mutagène de composés chimiques.

MATSUNAGA et collaborateurs (1984) ont proposé l'immobilisation de *Chlorella vulgaris* à l'extrémité d'une électrode à oxygène afin de mesurer la concentration des phosphates dans les eaux. Mais la limite de détection d'un tel dispositif ne descend pas au dessous de 8 mM (soit 640 mg/l). De plus l'appareillage n'est pas adapté à une utilisation *in situ*.

RIEDEL et collaborateurs (1989) rapportent que des capteurs à micro-organismes ont été proposés pour le dosage des nitrates et des nitrites. Ainsi, KARUBE et al. (1983) ont réalisé une sonde pour la détermination des nitrites dans l'atmosphère en employant *Nitrobacter sp* immobilisé au contact d'une électrode à oxygène.

KARUBE et TAMIYA (1987) indiquent l'existence d'un capteur à microsomes de foie de rat pour la détermination des sulfites. Le système de détection est basé sur la réaction d'oxydation des sulfites en sulfates réaction qui va consommer de l'oxygène.

La mise au point de capteurs mesurant la demande biochimique en oxygène (DBO) a fait l'objet de nombreux travaux. Ce paramètre reste, malgré son caractère aspécifique, le plus couramment utilisé pour la mesure de la pollution organique. Le premier biodétecteur dans ce domaine a été décrit en 1977 par KARUBE et collaborateurs. *Clostridium* est immobilisé au contact d'une électrode à oxygène ; ce système permet de suivre la consommation d'O₂ des micro-organismes correspondant à la mesure de la biodégradation (glucose et glutamate). Plus récemment une meilleure

reproductibilité et une diminution du temps de réponse ont été obtenues en remplaçant *Clostridium* par *Trichosporon cutaneum* (HIKUMA et al., 1979). D'autres organismes ont été testés tel que *Saccharomyces* et *Bacillus*. Le capteur développé avec *Trichosporon* a été commercialisé et est en cours de standardisation au Japon.

La recherche de biocapteurs pour les contrôles de toxicité reste encore limitée, si l'on se réfère à l'ensemble des travaux publiés dans ce domaine. Les principales données bibliographiques, concernant la détection des toxiques, sont résumées dans le tableau II ci-dessous.

Tableau II : Biodétecteurs appliqués à la mesure des toxiques.

Biocatalyseurs (références)	Transducteurs	Toxiques	Concentration
cholinestérase (1)	colorimétrie	pesticides	0,1/10 mg/l
cholinestérase (2)	él. platine	pesticides	0,1/20 mg/l
choline-oxydase, acétylcholines- térase (3)	él. platine (H ₂ O ₂)	pesticides	paraoxon aldicarbe 0,01/0,1 mg/l
cholinestérase (4)	fibre optique photodiodes (colorimétrie)	pesticides organo- phosphorés	paraoxon 0,005 mg/l
<i>B. subtilis</i> <i>S. typhimurium</i> (5)	él. à O ₂	produits mutagènes	2/20 mg/l
<i>Escherichia coli</i> (6)	él. à CO ₂	micropolluants métalliques	0,13/ 1,5 mg/l
phénol oxydase (7)	él. à O ₂	phénols	0,6/6 mg/l
<i>Synechococcus</i> (8)	él. carbone + médiateur	herbicides	min 0,02 mg/l

(1) SMITH 1985

(2) GOODSON et JACOBS 1974

(3) BERNABEI et al. 1991

(4) WOLFBEIS et KOLLER 1989

(5) KARUBE et al. 1981, 1982

(6) DORWARD et BARISAS 1984

(7) MACHOLAN et SCHANEL 1977

(8) RAWSON et al. 1987

D'autres biocapteurs appliqués à la mesure des toxiques ont été présentés au "Second International Workshop on Biosensors, 1989" mais les recherches restent pour l'instant au stade des préliminaires. NOACK et collaborateurs (1989) ont mis au point un capteur automatisé permettant la détection rapide des herbicides dans les eaux (rivières, lacs et eaux usées) ; ce biodétecteur est basé sur une mesure différentielle de fluorescence de cellules algales induite par le monuron et la fluorescence de l'échantillon. Ces auteurs ont obtenu pour une concentration de 5 mg/l d'isoproturon un empoisonnement de 99%.

De même HILPERT *et al.* (1989) ont travaillé au développement d'un capteur pour la détection des micropolluants métalliques. Plusieurs associations biocatalyseur-transducteurs ont été testées avec des protéines (phytochélatine, métallothionéines et glutathion) immobilisées au niveau de transistors à effet de champs, de cristaux piézo-électriques ou de détecteurs optiques. Ces protéines possèdent la propriété de former des groupements thiols en se liant avec les métaux.

De par leur conception, les biocapteurs s'adaptent parfaitement aux contrôles de toxicité des eaux. La mesure en temps réel convient tout à fait à des essais en dynamique et permet :

- des contrôles de toxicité en continu,
- des contrôles *in situ*,
- une automatisation des systèmes de détection ainsi constitués,
- la mise en place de systèmes d'alerte en cas de charge polluante anormalement élevée.

Les systèmes proposés, dans la littérature, ne dépassent pas le stade de laboratoire ; très peu sont en usage *in situ* pour le contrôle des micropolluants et de leur toxicité.

La nature même du réactif biologique pourrait expliquer cette difficulté à passer d'un stade laboratoire à un pilote. En effet, la sensibilité de ce réactif va être fonction des conditions de pH.

température, oxygénation et force ionique du milieu notamment ; paramètres qui peuvent varier rapidement *in situ*.

Ces paramètres, définis dans les tests standardisés de laboratoire, devront également être maintenus à un niveau déterminé dans les essais effectués à l'aide de biocapteurs. Ceci implique de réguler ces paramètres dans le flux à analyser, avant son passage au niveau de la membrane active. Le biocapteur, à proprement parler devra donc être assorti de systèmes de régulation qui vont compliquer l'infrastructure de l'analyseur et constituer autant de sources possibles de dysfonctionnement.

CHAPITRE 2

REACTIF BIOLOGIQUE : LES ALGUES

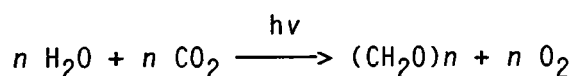
- **Activité photosynthétique**
- **Intérêt des algues unicellulaires pour l'évaluation de la toxicité des milieux aquatiques**
- **Utilisation des algues en biotechnologie**

2.1 Activité photosynthétique

2.1.1 Rappels sur la photosynthèse

Les algues unicellulaires sont reconnues comme étant les producteurs primaires du milieu aquatique (COUTURE et al., 1981 ; PARRISH, 1985) ; elles possèdent donc une place privilégiée dans les écosystèmes.

L'activité photosynthétique, caractéristique de tous les végétaux, leur permet de capter l'énergie solaire et de la transformer en énergie chimique. Cette transformation s'effectue en réduisant le CO_2 pour former des hexoses selon une réaction globale qui va libérer de l'oxygène :



Rappelons que la photosynthèse est caractérisée par deux types de réactions ; les réactions dites "lumineuses" qui dépendent de l'absorption de photons et les réactions dites "sombres" qui peuvent s'effectuer en l'absence de lumière. L'énergie lumineuse est utilisée durant la première phase de la photosynthèse, non seulement pour réduire le NADP^+ , mais aussi pour phosphoryler l'ADP. Les produits formés ATP et NADPH_2 interviennent dans les réactions de biosynthèse cellulaire (réactions "sombres") comme celle des glucides à partir du CO_2 au cours du cycle de Calvin.

2.1.2 Appareil photosynthétique

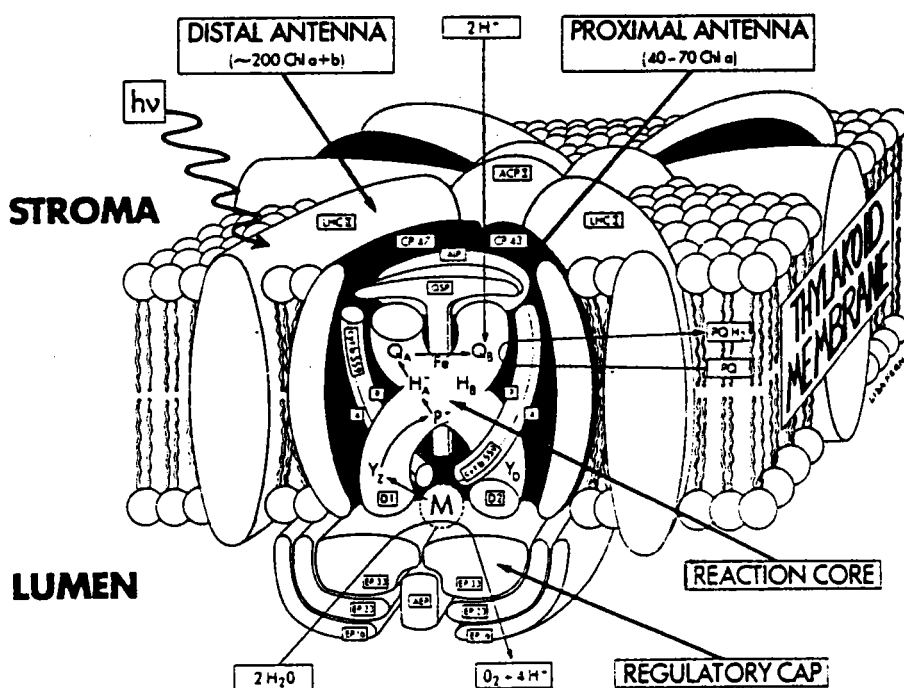
Chez les cellules eucaryotes, l'appareil photosynthétique est localisé dans les chloroplastes ; on ne trouve pas, en revanche, chez les procaryotes photosynthétiques d'organites différenciés, les composantes moléculaires du système photosynthétique se situant dans la membrane cellulaire.

L'énergie lumineuse est captée essentiellement par l'intermédiaire de la chlorophylle ; les deux autres catégories de pigments retrouvés chez les algues : pigments caroténoïdes et phycobilines étant de moindre importance.

Les molécules absorbantes sont regroupées en amas de plusieurs centaines de molécules appelés antennes. Chaque antenne va servir d'entonnoir permettant de collecter l'énergie lumineuse et de la diriger vers un seul centre réactionnel.

Les pigments photosynthétiques sont organisés en deux ensembles fonctionnels (photosystème I et II) qui sont connectés à des chaînes de transport d'électrons chez les algues eucaryotes et les cyanobactéries.

Le photosystème I, excité par un quantum lumineux va permettre la réduction de NADP^+ ; le photosystème II (cf figure 2), après excitation et émission d'électrons possède un caractère oxydant suffisamment important pour dissocier les molécules d'eau (KATZ, 1988).



Reaction core: centre réactionnel constitué de 2 sous unités protéiques D1 et D2 ; Regulatory cap: ensemble de protéines hydrophiles dont la fonction est de réguler l'apport en ions (Cl^- , Ca^{2+}) du cycle d'oxydation de l'eau ; Proximal Antenna, Distal Antenna: sous unités qui regroupent les molécules de pigments absorbant les photons lumineux ; M: atomes de manganèse intervenant dans le cycle d'oxydation de l'eau.

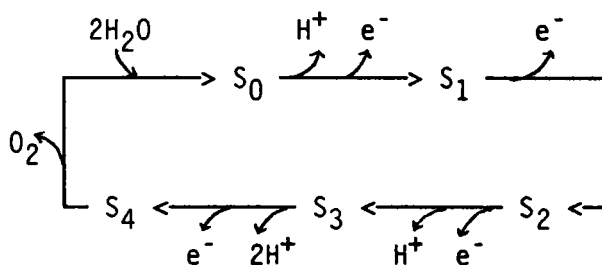
Figure 2 : Représentation schématique du photosystème II (adapté de HANSON et WYDRZYNSKI, 1990).

Lors d'une excitation lumineuse, le centre réactionnel du photosystème II transforme une partie de l'énergie lumineuse absorbée en énergie potentielle associée à une séparation de charges électriques. Le centre réactionnel du photosystème II passe par un état excité (P_{680}^*). Il se produit alors un transfert d'électrons au sein du photosystème II. Ce transfert fait intervenir différents couples oxydo-réducteurs comme la phéophytine et les quinones. L'électron émis vient combler le déficit électronique du photosystème I. La chaîne de transfert électronique au sein des chloroplastes est schématisée figure 3.

Le cycle de transfert électronique s'achève lorsque la totalité des composants du photosystème II redevient neutre. La tyrosine Z transmet un électron au P_{680}^* et comble son déficit électronique en captant un électron fourni par le cycle d'oxydation de l'eau (GOVINDJEE et COLEMAN, 1990).

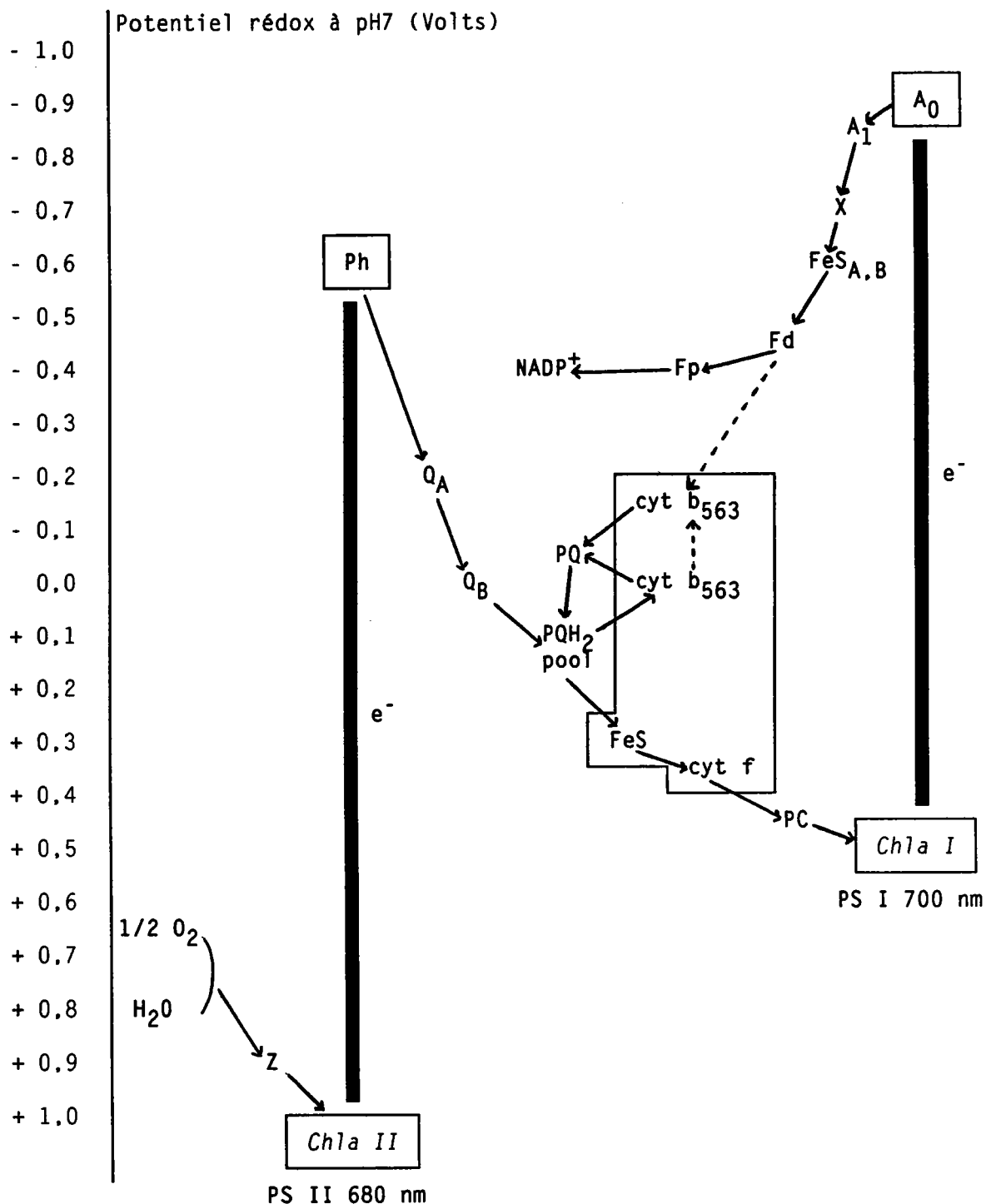
2.1.3 Cycle d'oxydation de l'eau

Ce cycle d'oxydation de l'eau, faisant intervenir des atomes de manganèse, est un mécanisme en quatre étapes qui va fournir quatre électrons pour deux molécules d'eau dissociées (WYDRZYNSKI et al., 1989 ; HANSON et WYDRZYNSKI, 1990). Ce complexe producteur d'oxygène peut exister sous 5 états d'oxydation croissante S_0 , S_1 , S_2 , S_3 , S_4 (RUTHERFORD, 1989). Lorsqu'il se trouve dans l'état S_4 , il a fourni 4 électrons et retourne à l'état S_0 en libérant de l'oxygène gazeux.



L'élimination des ions Cl^- au niveau du PSII entraîne une inhibition réversible du mécanisme de libération d'oxygène sans affecter le transfert d'électron au sein du PS II aussi longtemps qu'un donneur d'électron exogène est présent (BRUDWIG et al., 1989). GOVINDJEE et COLEMAN (1990) proposent diverses hypothèses quant au rôle de ces ions chlorures dans le cycle d'oxydation de l'eau. Ces ions pourraient favoriser la libération des protons à partir de l'eau soit en augmentant directement l'efficacité des

réactions d'oxydation de l'eau soit en stabilisant les ions manganèse les plus chargés des états supérieurs. Les ions chlorures pourraient également organiser les protéines du PS II en un système stable.



Z: tyrosine (donneur primaire du PS II) ; Ph: phéophytine (accepteur d'électrons intermédiaire) ; Q_A , Q_B : quinones (respectivement accepteurs primaire et secondaire stables du PS II) ; PQ, PQH_2 : plastoquinone ; FeS, cyt f, cyt b_{563} : composants du complexe cytochrome b_6f ; PC: plastocyanine ; A_0 , A_1 : accepteurs primaires du photosystème I ; X, $FeS_{A,B}$: composés à groupements fer-soufre ; Fd: ferrédoxine ; Fp: ferrédoxine NADP oxydoréductase

Figure 3 : Chaîne de transfert électronique au sein des chloroplastes après excitation lumineuse (d'après BOWYER et CAMILLERI, 1987).

2.2 Intérêt des algues unicellulaires pour l'évaluation de la toxicité des milieux aquatiques

Les algues unicellulaires, compte tenu de leur activité photosynthétique, représentent la majeure partie des producteurs primaires du milieu aquatique. A ce titre, ces organismes constituent le premier maillon des chaînes trophiques et il apparaît donc essentiel de connaître et prévenir l'impact des xénobiotiques à ce niveau.

Les algues unicellulaires sont, en effet, considérées comme les piliers de l'organisation du biota aquatique de telle sorte que si leur croissance est affectée, la biomasse des niveaux supérieurs en subira d'autant les répercussions (COUTURE et al., 1981). Les algues représentent la source alimentaire et énergétique des organismes situés aux niveaux supérieurs de la chaîne trophique, donc une productivité trop faible ou inversement trop élevée va se révéler néfaste pour les organismes des niveaux supérieurs.

Cette place particulière des algues dans les écosystèmes a favorisé l'agrément et l'augmentation constante de l'utilisation des bioessais sur micro-algues pour prédire et déterminer l'impact des substances toxiques sur l'environnement aquatique.

Les essais sur algues, développés initialement pour étudier les phénomènes d'eutrophisation, ont été utilisés par la suite pour la détermination des effets toxiques des micropolluants métalliques, des pesticides ou des effluents industriels complexes. Le protocole de ces essais est bien défini ; ces tests constituent une méthode standardisée pour l'étude de la qualité des eaux et de la toxicité des substances chimiques recommandés par l'ISO, l'OCDE, l'AFNOR et l'EPA.

Ces essais sont demandés pour la constitution des dossiers de notification concernant la mise sur le marché de produits chimiques nouveaux, classés au niveau I selon la 6^{ème} directive des Communautés Européennes (CEE, 1979). Ils seront requis au niveau du dossier de base dès l'application de la 7^{ème} directive.

Les algues possèdent la propriété de fixer et de concentrer certaines substances chimiques présentes dans le milieu aquatique.

La biosorption des micropolluants métalliques est essentiellement liée à la composition de la paroi cellulaire ; celle-ci étant riche en

protéines et polysaccharides qui sont capables de fixer les métaux par leurs groupements hydroxyles, carboxyles ou autres groupements nucléophiles tels que SH ou NH_2 (THARREAU 1990). Des facteurs de concentration du cadmium allant jusqu'à 16 000 ont pu être observés pour certaines espèces algales (FERARD, 1986). Les algues unicellulaires bioaccumulent également les micropolluants organiques lipophiles tels que pesticides rémanents et PCB (BOYLE, 1984). *Skeletonema costatum* ou *Nostoc muscorum* présentent ainsi des facteurs de concentration supérieurs à 15 000 pour la dieldrine.

Cette capacité des algues à bioaccumuler les substances chimiques peut conduire à des phénomènes de biomagnification des concentrations pour les niveaux supérieurs des chaînes trophiques. Les concentrations très élevées, trouvées aux maillons supérieurs, peuvent alors entraîner l'apparition d'effets toxiques très importants se traduisant à plus ou moins long terme par la disparition d'espèces.

2.2.1 Critères de la toxicité sur algues

Les essais sur algues ont pour objectif d'évaluer les effets toxiques des substances chimiques, simples ou complexes, sur les producteurs primaires du milieu aquatique.

Deux approches sont généralement envisagées pour évaluer les répercussions de ces substances toxiques sur les algues unicellulaires : soit des tests sur des populations monospécifiques au laboratoire soit des études sur les communautés phytoplanctoniques *in situ* ou transportées au laboratoire (WONG et COUTURE, 1986).

Les essais sur des populations monospécifiques sont effectués essentiellement dans des conditions statiques ; c'est à dire que la substance toxique est ajoutée dans le milieu réactionnel en début de test. Les effets sont ensuite mesurés après plusieurs jours de temps de contact. Il n'y a aucun apport de milieu nutritif frais ni aucune suppression des produits cataboliques durant l'expérimentation.

Le système étant fermé, les variations de pH, les teneurs en O_2 et les teneurs en nutriment vont constamment varier en fonction de l'augmentation de la biomasse algale (WONG et COUTURE, 1986).

L'utilisation de systèmes en dynamique permet d'exposer les algues à un flux continu de la solution toxique, de nutriments et ainsi de se

rapprocher des conditions du milieu naturel. Ces essais sont généralement appliqués pour la mise en évidence des effets chroniques lors d'expositions à moyen et long terme (GEA, 1980).

Des modifications dans la structure des communautés phytoplanctoniques, qu'elles interviennent dans la diversité ou dans l'abondance des espèces, peuvent servir d'outil pour caractériser les effets directs des substances toxiques (AMBLARD et al., 1990). La mesure des rapports production/biomasse ou ATP/AMP peut se révéler utile pour détecter les effets insidieux des xénobiotiques au niveau de la communauté algale, alors que ces mêmes effets toxiques mesurés par modification de cette communauté ne sont pas perceptibles (COUTURE et al., 1987).

Le caractère toxique d'une substance chimique va pouvoir s'exprimer en modifiant l'intégrité structurale du micro-organisme testé ou bien se traduire par des altérations biochimiques fonctionnelles (synthèse des acides nucléiques ou des protéines, inhibition d'activités enzymatiques spécifiques).

BOYLE (1984) répertorie différentes techniques de mesure des effets directs des toxiques sur algues :

- assimilation du CO_2 marqué par l'intermédiaire de la photosynthèse,
- quantification de la production de l'oxygène photosynthétique,
- mesure de la croissance basée sur la modification de la numération cellulaire,
- mesure des critères physiologiques et de l'activité biochimique.

D'une manière plus générale, MUNAWAR et al. (1989) ont regroupé les indicateurs permettant d'évaluer l'état de santé d'une communauté phytoplanctonique *in situ* (figure 4). Ces indicateurs peuvent être représentatifs de la structure de la communauté, de l'aspect des cellules ou bien de leurs fonctions biochimiques.

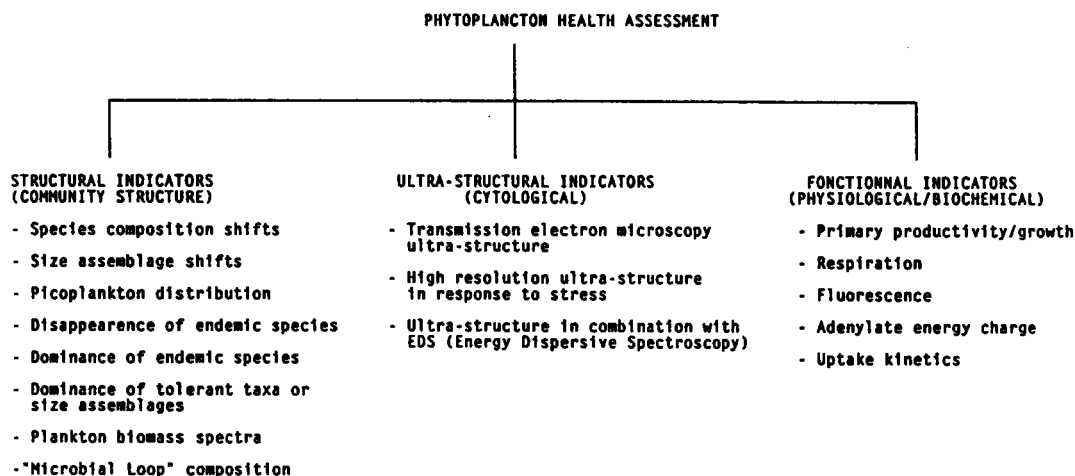


Figure 4 : Indicateurs de l'état de santé des communautés phytoplanctoniques *in situ* (d'après MUNAWAR et al., 1989).

2.2.1.1 Estimation de la biomasse algale

De tous les critères étudiés pour évaluer les effets toxiques, le plus couramment utilisé reste la mesure de la croissance algale (WONG et COUTURE, 1986).

L'effet du toxique est déterminé par comptage du nombre de cellules à intervalle de temps régulier en comparant cette croissance à celle d'une culture témoin.

Cette détermination de la concentration algale peut s'effectuer par comptage microscopique ou à l'aide d'un compteur de particules (CHRISTENSEN et al., 1979). Le comptage microscopique, s'il s'avère fastidieux, permet, en revanche, de recueillir des informations sur les altérations morphologiques pouvant résulter de l'exposition à la substance toxique.

La croissance de la population algale peut être évaluée par mesure du poids sec après filtration et séchage à 105°C (ABOU WALY et al., 1991). Cette technique est moins souvent utilisée que le comptage cellulaire et s'applique difficilement lorsque les inocula de départ sont faibles : 10^3 ou 10^4 cellules/ml.

LEHMACHER et SCHANZ (1989) estiment l'accroissement de la biomasse algale par mesure de la consommation d'une solution de KMnO_4 0.1N en fin de test. Ces auteurs indiquent une correspondance de résultats avec une mesure du poids sec ou une détermination du taux de chlorophylle.

La mesure des pigments photosynthétiques est également fréquemment appliquée pour estimer la biomasse algale ; la chlorophylle pouvant être mesurée *in vivo* ou *in vitro* par fluorescence ou par opacimétrie (PARRISH, 1985).

La longueur d'onde pour la mesure de la suspension algale, *in vivo*, peut varier selon les auteurs. NYHOLM et DAMGAARD (1990) préconisent une longueur d'onde de 600 nm pour *Selenastrum capricornutum* tandis que KLAPWIJK et al. (1989) utilisent une mesure à 680 nm corrigée par la densité optique à 750 nm pour vérifier la turbidité de l'échantillon.

WALSH et MERILL (1984) indiquent que la mesure du taux de chlorophylle total par spectrophotométrie donne uniquement une estimation approximative de la quantité et de l'état physiologique de la biomasse algale. Le taux de chlorophylle par cellule, par rapport à la chlorophylle totale, donnerait une meilleure estimation de l'effet toxique.

Différents solvants sont utilisés pour extraire et doser la chlorophylle : acétone, méthanol, éthanol ou DMSO. SARTORY et GROBBELAAR (1984) ont constaté une meilleure efficacité d'une extraction à l'éthanol ou au méthanol pour doser la chlorophylle chez les algues vertes et les cyanophycées, comparativement aux autres techniques. La mesure de l'extrait acidifié permet d'évaluer la concentration en phéopigments (AFNOR 1984a). Ces méthodes spectrophotométriques, par contre, surestiment les teneurs en chlorophylle et phéophytine (SARTORY, 1985). Une détermination par HPLC puis fluorimétrie est alors préférable (SARTORY, 1985 ; AFNOR 1984b).

La fluorescence, moins fréquemment employée, se révèle beaucoup plus sensible que la mesure d'absorption de lumière à une longueur donnée (NYHOLM et KALLQVIST, 1989). Les techniques *in vivo* sont sensibles, précises et ne nécessitent pas de phases d'extraction avant dosage.

La variation de fluorescence δF est un paramètre utilisé par COUTURE et al. (1981) dans des essais de toxicité comme bioindicateur de l'état physiologique de la population algale testée ; ces auteurs ayant observé

une diminution du δF en fonction des concentrations croissantes en toxique. Ce paramètre tient compte à la fois de la concentration des cellules algales et de leur état physiologique ; il est défini par la relation suivante :

$$\delta F = F_{\text{DCMU}} - F$$

où F_{DCMU} = fluorescence induite par le DCMU à 10^{-5}M ,
et F = fluorescence de l'échantillon *in vivo*

La teneur en adénosine triphosphate (ATP) est un indicateur sensible de la biomasse active et va dépendre de l'état physiologique des cellules (VASSEUR et al., 1981 ; VAN COILLIE et al., 1983). Ce paramètre indique, en effet, l'intensité du métabolisme des cellules algales et permet d'enregistrer les perturbations dues à des substances toxiques. La variation très rapide de la teneur en ATP d'organismes cellulaires maintenus dans des conditions défavorables en fait un critère de toxicité sensible et précoce, bien adapté aux études de toxicité aiguë (VASSEUR et al., 1981).

L'ATP est extrait des cellules algales par le DMSO, il est ensuite dosé par bioluminescence après addition du complexe luciférine-luciférase (COUTURE et al., 1981).

Il existe une bonne corrélation entre la teneur en ATP et la mesure de la biomasse par numération cellulaire ou l'assimilation de carbone marqué (PARRISH, 1985). Le rapport ATP/cellule (THOMPSON et al., 1987 ; COUTURE et al., 1989) est un bon indicateur de la capacité de reprise de cultures algales pendant la période d'exposition au toxique.

La modification du pool d'ATP des cellules algales est rapide ; BLAISE (1984) a expérimenté, de ce fait, un microtest algal d'une durée de 4 heures en utilisant l'ATP comme critère de mesure pour déterminer les effets toxiques de rejets liquides.

La charge énergétique de l'adénosine ("adenylate energy charge") peut également être utilisée pour mesurer les effets des effluents sur le phytoplancton (WALSH et MERILL, 1984). Cette charge énergétique est représentative de l'état physiologique du phytoplancton (FALKOWSKI, 1977) ; elle est définie par la relation :

$$CE_A = \frac{([ATP] + 1/2 [ADP])}{([ATP] + [ADP] + [AMP])}$$

Les trois nucléotides AMP, ADP, ATP sont, en effet, impliqués dans tous les processus énergétiques cellulaires : biosynthèse, transport actif, mobilité, induction enzymatique et transfert de l'information génétique.

La détermination du facteur CE_A nécessite la transformation enzymatique de l'AMP et ADP sous forme d'ATP pour être dosés.

AMBLARD et al. (1990) utilisent, pour leur part, la détermination des nucléotides ATP et ADP pour calculer la biomasse carbonée de populations algales à l'aide d'un facteur correctif selon la formule :

$$C_v = ([ATP] + [ADP]) \times 130$$

2.2.1.2 Mesure de l'activité photosynthétique

La mesure de l'activité photosynthétique de populations algales est un paramètre fréquemment suivi pour mettre en évidence les effets toxiques des polluants. Cette activité peut être quantifiée par le suivi du dégagement d'oxygène ou par une évaluation de la production primaire des algues qui va se traduire par une assimilation de CO_2 marqué.

Ces essais donnent des réponses plus rapides que les tests d'inhibition de croissance classique et présentent également l'avantage de localiser le site d'action du produit testé.

Le complexe enzymatique associé à la réaction de photolyse de l'eau se révèle l'une des composantes les plus sensibles de l'appareil photosynthétique. L'inhibition de la production d'oxygène consécutive à une excitation lumineuse a donc été considérée comme intéressante et rapide pour évaluer la toxicité des substances chimiques : qu'il s'agisse d'herbicides (KRATKY et WARREN, 1971a) ou bien de métaux (OVERNELL, 1975 ; OVERNELL, 1976 ; CALLEGARI et LANNOYE, 1981).

Les méthodologies utilisées pour évaluer l'assimilation du ^{14}C varient de manière importante selon les auteurs. COUTURE et al. (1981) préconisent un temps d'incubation de 10 minutes avec du $NaH^{14}CO_3$ après un

temps de contact des cellules algales avec le toxique qui varie de 1 à 14 jours. L'assimilation est ensuite stoppée, puis les cellules sont exposées à une lumière intense pour assurer la destruction de la chlorophylle. LACAZE (1987) a soumis, pour sa part, *Phaeodactylum tricornutum* à des extraits aqueux de sédiments marins durant 96 heures, la période d'incubation avec le carbone marqué étant de 4 heures. L'échantillon a ensuite été filtré puis la radioactivité mesurée par scintillation liquide.

Un même temps d'incubation de 4 heures a été choisi par WONG et CHAU (1990), mais le temps de contact *Selenastrum capricornutum* - sels de zinc est réduit à 24 heures. Par des extractions avec différents solvants, il est possible d'affiner l'expérience en déterminant l'incorporation du carbone inorganique dans les macromolécules : lipides, protéines et polysaccharides (AMBLARD et al., 1990).

NYHOLM et DAMGAARD (1990) ont développé un test à court terme d'assimilation du ^{14}C d'une durée totale de 6 heures incluant la période de contact toxique - cellules algales et la période d'incubation avec le carbone marqué. Les CI 50 déterminées par ce test à court terme sont plus élevées que celles obtenues par un essai d'inhibition de croissance de 96 heures. Néanmoins, pour des produits tels que l'anisole ou le cuivre (Cu^{2+}) les gammes de concentrations toxiques sont du même ordre.

2.2.1.3 Mesure des activités biochimiques fonctionnelles

Des critères plus spécifiques reflétant le métabolisme ou une fonction biochimique particulière sont également employés pour estimer l'influence des polluants sur ces algues unicellulaires. L'inhibition de la synthèse des acides nucléiques ou des protéines peut traduire des effets toxiques.

Afin d'évaluer les taux de synthèse, des précurseurs radioactifs incluant du ^{14}C ou ^3H sont utilisables comme la L leucine pour la synthèse des protéines, l'uridine pour l'ARN et la thymidine dans le cas de l'ADN (VAN COILLIE et al., 1983).

La mesure du taux de protéosynthèse a été employée par VAN COILLIE et al. (1981) pour simuler l'influence de la mise en eau de réservoirs d'eau potable. L'incorporation de la L leucine dans la fraction protéique est rapide, inférieure à 60 minutes.

GADKARI (1987), pour sa part, a estimé le caractère toxique d'herbicides inhibiteurs de la photosynthèse en mesurant l'activité nitrogénase chez *Anabaena cylindrica* et *Nostoc noscorum*.

Des essais portant sur la toxicité des polluants métalliques ont indiqué que la fixation de l'azote moléculaire chez *Anabaena spiroides* était plus sensible que le paramètre d'inhibition de croissance (KOSTAYEV, 1980). Parallèlement, les études menées sur la perméabilité membranaire ont montré une fuite extracellulaire de K^+ et Na^+ . Ce changement de perméabilité cellulaire se manifeste dès les premières minutes après contact avec le zinc ou le cobalt, alors que la fixation d'azote moléculaire ou le taux de photosynthèse ne sont pas affectés.

La comparaison de l'inhibition de croissance chez *Selenastrum capricornutum* avec le taux d'assimilation de phosphate indique que cette dernière technique est plus sensible pour estimer les effets toxiques du dichromate de potassium et du 3,5-dichlorophénol (NYHOLM, 1991).

2.2.1.4 Cytométrie de flux

La cytométrie de flux est une méthode analytique qui permet de compter, analyser, trier sélectivement les cellules biologiques de populations complexes. MUNAWAR et al. (1989) considèrent que cette technique, appliquée aux cellules algales, est promise à un développement rapide pour la protection des environnements aquatiques.

Les cellules, injectées dans le capillaire du cytofluorographe, vont passer au travers d'un faisceau laser qui va exciter tous les fluorochromes présents et réagir avec la surface et les structures internes cellulaires. Différents paramètres optiques comme la fluorescence des cellules et la dispersion de la lumière (CUNNINGHAM et LEFTLEY, 1986) sont mesurés pendant un temps très court de passage des cellules devant le laser.

L'analyse et le traitement des données recueillies sont mises en mémoire et permettent d'effectuer un tri des cellules à partir des signaux optiques obtenus et de la mesure du volume cellulaire.

La plupart des techniques de coloration utilisant des marqueurs fluorescents sont applicables à la cytométrie de flux. Ainsi, il est possible, selon le marqueur employé, de mesurer la quantité d'ADN, d'ARN, le taux de protéines par cellule, et également d'estimer le pH

intracellulaire ou tester la viabilité cellulaire (CUNNINGHAM et LEFTLEY, 1986).

TRASK et al. (1982) ont pu identifier différentes espèces algales en combinant plusieurs paramètres optiques : propagation du rayon, fluorescence de la chlorophylle, coloration de l'ADN cellulaire (HO 33342 ou DAPI (4'-6'diaminido-2-phénylindole)). D'autres colorants sont également utilisables pour mettre en évidence cet ADN : mithramycine (YENTSCH et al., 1983), bromure d'éthidium (BONALY et MESTRE, 1982), acridine orange (BONALY et al., 1987).

LEFORT-TRAN et al. (1988) ont déterminé par cytométrie de flux les différentes phases du cycle cellulaire chez *Euglena gracilis* en fonction du stade de croissance de la culture. La modification du cycle ou l'arrêt en phase de réplication sont des éléments qui peuvent indiquer des altérations de la cellule par des agents toxiques externes.

2.2.2 Tests normalisés d'inhibition de croissance

Les techniques, ayant pour objectif l'évaluation de la toxicité d'effluents ou de produits chimiques sur les cellules algales, sont variées. Elles se caractérisent par une estimation globale de la toxicité (mesure de la biomasse) ou bien cette détection peut être affinée par une mise en évidence de la modification de l'intégrité structurale des micro-organismes ou une atteinte des fonctions biochimiques de la cellule.

La plupart de ces techniques, si elles présentent une sensibilité élevée, nécessitent un appareillage sophistiqué, coûteux et un temps de préparation important (détermination de l'ATP, mesure de l'assimilation du ^{14}C ou des précurseurs radioactifs de la synthèse des acides nucléiques et protéines...). Ces méthodes sont plus adaptées à des recherches fondamentales qu'à des essais en routine.

Les tests algues normalisés par l'AFNOR, l'OCDE, l'ISO et EPA sont réalisés en statique avec des conditions d'exposition (température, agitation, milieu, lumière) bien définies. La substance toxique est ajouté en début de test ; les effets physiologiques sont ensuite mesurés après plusieurs jours de culture (3 à 8 jours).

Ces tests doivent être sensibles, avoir un coût de revient faible et être utilisables en routine. Un critère global de mesure, l'évaluation de la croissance algale, a donc été retenu pour mettre en évidence les effets

toxiques des substances chimiques. Les mesures sont effectuées par comptage direct des cellules ou par des techniques spectroscopiques. Elles permettent la détermination d'une CI 50, CI 10 et CI 90 ainsi qu'un seuil algistatique et algicide.

Un souci d'allègement de cette méthodologie ainsi que l'accroissement du nombre d'essais a conduit à la mise au point des tests algues réalisés en microplaques (BLAISE, 1984 ; BLAISE et al., 1986).

Les espèces algales préconisées doivent satisfaire à plusieurs critères pour être utilisables dans ces tests d'écotoxicité. Celles-ci doivent être sensibles, représentatives des milieux aquatiques, ne pas sécréter d'autotoxines, ne pas présenter d'agrégation cellulaire et croître dans un milieu nutritif simple. Ainsi des chlorophycées d'eau douce telles que *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus subspicatus* ou *Selenastrum capricornutum* ont été retenues pour la réalisation de ces essais (VASSEUR et JOUANY, 1986).

2.3 Utilisation des algues en biotechnologie

Les micro-algues procaryotes ou eucaryotes ont suscité un intérêt dans des domaines autres que celui des contrôles de toxicité en milieu aquatique. Ces organismes unicellulaires trouvent, en effet, des applications dans des secteurs aussi variés que l'alimentation (animale ou humaine), la cosmétologie, la production d'énergie ou l'épuration des eaux (Cf figure 5).

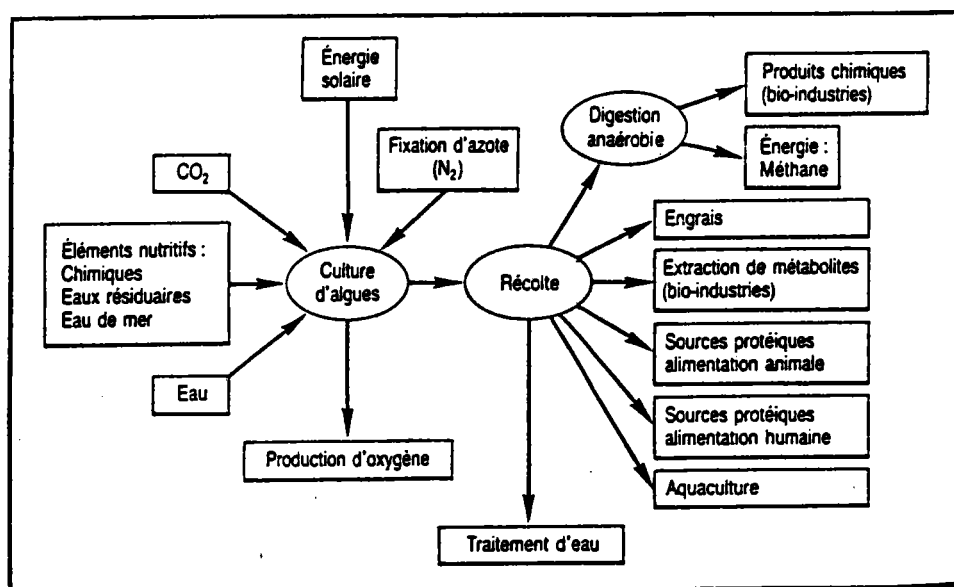


Figure 5 : Domaines d'applications des cultures de micro-algues (d'après CALLEGARI, 1989).

Les algues unicellulaires représentent la principale source de nourriture en aquaculture pour l'élevage à l'échelle commerciale des poissons, mollusques et crustacés. BAUD et collaborateurs (1990) ont, par exemple, mis en évidence l'intérêt de l'apport de *Skeletonema costatum* sur la croissance de *Ruditapes philippinarum* (palourde japonaise). Cet apport augmente la taille moyenne finale et la quantité de chair avant la commercialisation.

Les teneurs en acides aminés ainsi que la nature des lipides de ces micro-algues vont influencer de manière importante sur la croissance des bivalves (CALLEGARI, 1989).

Des expériences de nutrition sur des porcs, rats, souris ont démontré l'apport protéique élevé de diverses espèces algales : *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Spirulina*, leur incorporation dans la ration alimentaire n'entraînant pas d'effets toxiques (DE LA NOUE et DE PAUW, 1988).

Les cyanophycées, chlorophycées ou diatomées excrètent de nombreuses vitamines hydrosolubles (vit B₁₂, B₆, B₁, biotine, C). Cette libération dans le milieu peut être importante puisque *Anabeana hassili* va excréter 94% de la biotine synthétisée (CALLEGARI, 1989). Des cultures de *Chlorella* et *Porphyridium* sont actuellement exploitées en réacteur clos pour la production de vitamines au Japon et à Taiwan.

Les recherches concernent également le contenu en lipides de ces algues unicellulaires (acides linoléique, linolénique et eicosa-pentaénoïque), composants essentiels de l'alimentation humaine, ainsi que la teneur en pigments pouvant être utilisés comme colorants dans l'industrie alimentaire.

Des eaux résiduaires non toxiques d'origine domestique, industrielle ou agricole peuvent être épurées par des populations mixtes algues / bactéries. Les produits d'oxydation bactérienne sont assimilés par les algues et l'oxygène photoproduit sert de substrat à l'oxydation aérobie de l'effluent par les micro-organismes (CALLEGARI, 1989). Il est possible, pour des effluents riches en azote et phosphore, de diminuer les concentrations de ces composés de 90% environ (DE LA NOUE et DE PAUW, 1988).

Ces techniques d'épuration, dans un souci de rentabilité et aussi de salubrité, sont généralement couplées avec des systèmes de production de biomasse algale pour l'alimentation animale ou pour l'extraction de certaines substances chimiques (DE LA NOUE et DE PAUW, 1988).

L'épuration d'effluents chargés en métaux cadmium et chrome a été envisagée en utilisant des algues unicellulaires compte tenu de leurs capacités de fixation élevées (THARREAU, 1990).

La culture des algues unicellulaires revêt un intérêt en qui concerne l'extraction des produits de base pour les bio-industries (lipides, glycérol, hydrocarbures, polysaccharides) ou de produits biologiquement actifs (toxines, inhibiteurs d'enzymes, antibiotiques et antifongiques). GUDIN (1989) indique l'existence au stade pilote de réacteurs utilisant *Botryococcus braunii* pour la production d'hydrocarbures. Le niveau commercial est atteint pour la production de phycobiliprotéines par des Rhodophycées (CALLEGARI, 1989).

L'immobilisation du matériel biologique est une technique de plus en plus fréquemment appliquée pour favoriser la production extracellulaire des micro-algues. Cette technique présente en effet de nombreux avantages par rapport à l'utilisation de réacteurs. Elle permet une séparation effective du biocatalyseur avec le milieu, ce qui facilite la récupération des produits ; elle permet, en outre, l'augmentation de la densité algale ainsi que la conservation et le recyclage du biocatalyseur (TREVAN et MAK, 1988 ; CALLEGARI, 1989).

MUALLEM et al. (1983) ont immobilisé diverses espèces de cyanobactéries par adsorption sur une mousse de polyuréthane pour produire H_2 et $NADPH_2$. BAILLEZ et al. (1988) ont appliqué la même technique pour produire des composés carbonés avec *Botryococcus braunii*.

Après extraction des produits économiquement intéressants, la majeure partie de la biomasse algale se trouve sous forme de résidus cellulaires qui peuvent être convertis par fermentation en méthane ou alcool.

CHAPITRE 3

DEVELOPPEMENT DE CAPTEURS A ALGUES IMMOBILISEES

- **Mesure du flux électronique**
- **Mesure de l'oxygène photosynthétique**

L'intensité de l'activité photosynthétique d'algues unicellulaires a été envisagée comme pouvant être représentative de la pollution des milieux aquatiques sur les espèces végétales. Deux phénomènes traduisant cette activité photosynthétique et consécutifs à une excitation lumineuse ont été étudiés et appliqués à la réalisation de biocapteurs : émission d'un flux d'électrons et production d'oxygène.

L'amplitude du signal mesuré va être diminuée en présence de polluants agissant sur l'activité photosynthétique. L'affaiblissement du signal enregistré traduira donc la toxicité des produits testés.

Le choix de biocatalyseurs cellulaires nous est apparu plus performant pour la mise en évidence de la toxicité d'effluents multicomposites, le spectre de sensibilité de tels capteurs étant, en effet, beaucoup plus large que celui de systèmes enzymatiques plus spécifiques. La préparation des bioélectrodes à cellules entières est aussi plus simple et permet d'élargir la plage d'utilisation de ce capteur (pH et température notamment) comparativement à l'utilisation d'enzymes ou d'organites cellulaires.

3.1 Système de mesure du flux électronique

Ce système quantifie le transfert d'électrons le long de la chaîne photosynthétique consécutivement à des stimuli lumineux. Les algues unicellulaires sont immobilisées par filtration sur membrane et placées au contact d'un détecteur électrochimique. Ce transducteur, de nature ampérométrique, mesure les courants faradaïques qui se produisent lorsque des électrons sont échangés entre un système biologique et une électrode maintenue à un potentiel approprié (HIGGINS et LOWE, 1987). Cette catégorie de détecteurs se caractérise par l'application d'un potentiel constant entre l'électrode de travail et une électrode auxiliaire maintenue à un potentiel de référence. Le composé détecté va subir une oxydation ou une réduction à l'électrode de travail ; le courant mesuré est alors directement proportionnel à la concentration du produit à la surface de

l'électrode. Le potentiel imposé doit être suffisant pour permettre à la réaction d'oxydo-réduction de se produire.

La paroi cellulaire agit comme une barrière à l'échange d' e^- entre les composés oxydo-réducteurs de la cellule et l'électrode collectrice (BENNETO et al., 1983) et s'oppose ainsi au transfert direct des électrons entre le biocatalyseur et l'électrode. Ce rôle de barrière de la paroi algale a été confirmé par CARPENTIER et MIMEAULT (1987) et PURCELL et al. (1990) qui ont pu mesurer un photocourant directement en utilisant des membranes de thylacoïdes de feuilles d'épinard en solution ou immobilisées.

Cette impossibilité de réaliser une mesure directe du flux d'électrons nous a conduit à utiliser des molécules électro-actives ou médiateurs qui vont détourner les électrons émis au niveau des chloroplastes et les transférer à l'électrode. Ces médiateurs vont détourner les électrons de leur accepteur naturel et agir comme un accepteur terminal d'électrons (FREW et HILL, 1987).

Ces molécules électro-actives doivent répondre à différentes caractéristiques pour être utilisées comme médiateur :

- la réaction d'oxydo-réduction doit être rapide, réversible, avec le biocatalyseur et à l'électrode,
- le médiateur doit être * stable sous sa forme oxydée ou réduite quelque soit le pH du milieu,
* non toxique pour le biocatalyseur,
- le potentiel rédox doit être choisi de manière à éviter des interférences électrochimiques susceptibles de se produire avec les autres substances chimiques présentes en solution (HIGGINS et LOWE, 1987 ; TURNER, 1987).

LOWE (1985) a recensé différents composés pouvant être utilisés comme médiateur pour des électrodes à enzymes : benzoquinone, polyviologène, chloranil, bleu de méthylène et dérivés du ferrocène. De même HIGGINS et LOWE (1987) préconisent l'utilisation du 2,6-dichlorophénolindophénol (DCPIP), et celle du ferricyanure de potassium

pour coupler électrochimiquement la glucose oxydase à l'électrode de travail pour la détermination du glucose en solution.

Le médiateur peut se trouver soit sous forme soluble et libre dans la solution soit immobilisé au contact de l'électrode de travail. VINCKE et al. (1985) ainsi que RAWSON et al. (1987) ont utilisé le ferricyanure de potassium en solution pour déterminer respectivement la teneur en L-lactate à partir de levures immobilisées et l'intensité de l'activité photosynthétique chez *Synechococcus*.

Les dérivés du ferrocène sont le plus souvent immobilisés sur des électrodes de carbone ce qui permet de prévenir la diffusion du médiateur au delà de la surface active de l'électrode (HALE et al., 1989). Ces capteurs à médiateurs immobilisés ont atteint le stade commercial notamment pour le dosage du glucose en solution (GUILBAULT et LUONG, 1989).

Nous avons utilisé des médiateurs solubles pour ces essais. Ceux-ci se trouvent sous forme oxydée en solution, ils vont interférer au niveau de la chaîne de transfert électronique et se réduire en agissant comme un accepteur terminal d'électrons.

La réoxydation du médiateur entraîne la production d'un courant mesuré par le circuit externe. L'amplitude de ce courant de réoxydation du médiateur est proportionnelle à l'activité photosynthétique du biocatalyseur. Le mode d'action du médiateur est schématisé figure 6.

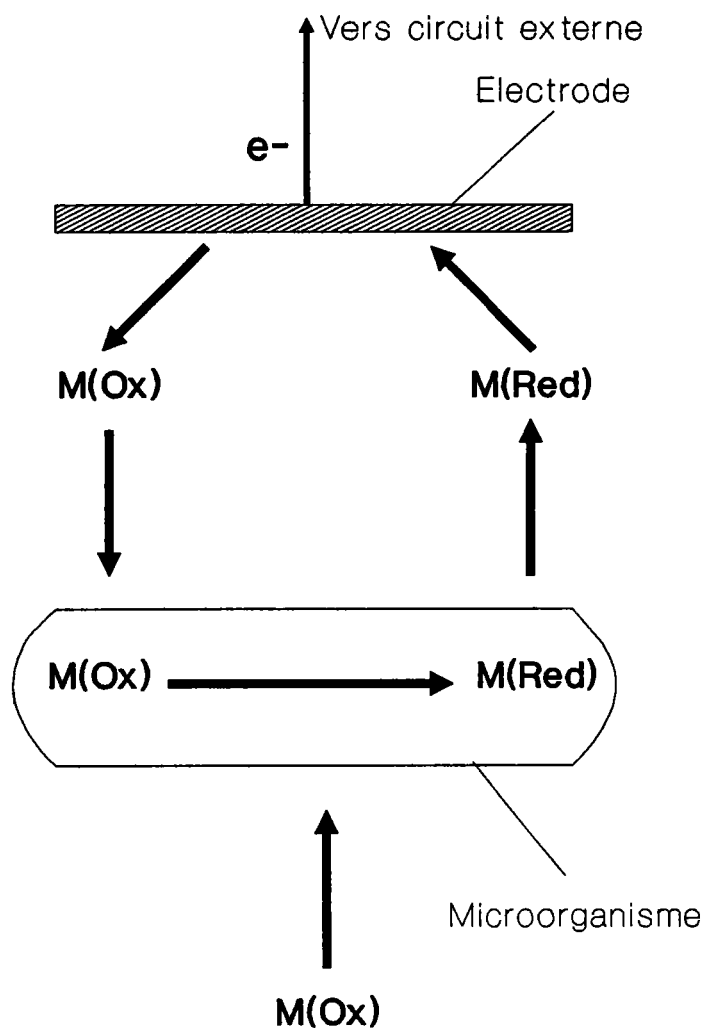


Figure 6 : Principe d'action du médiateur en solution (M(Ox) représente la forme oxydée du médiateur, M(Red) la forme réduite).

3.1.1 Appareillage utilisé

3.1.1.1 Cellule électrochimique

L'appareillage utilisé est de conception identique à celui décrit par RAWSON et collaborateurs (1987) pour la détection des herbicides par *Synechococcus* dans les eaux de surface. La cellule électrochimique est incorporée dans un bloc de Plexiglas ; la circulation du milieu s'effectue de manière tangentielle à la surface du biocapteur permettant ainsi une circulation continue du milieu au niveau des électrodes comme représenté figure 7.

La cellule électrochimique est alimentée en continu par l'intermédiaire d'une pompe péristaltique multicanaux (WATSON MARLOW 202 U, Falmouth, G.B.). Le débit choisi est de 2ml/min.

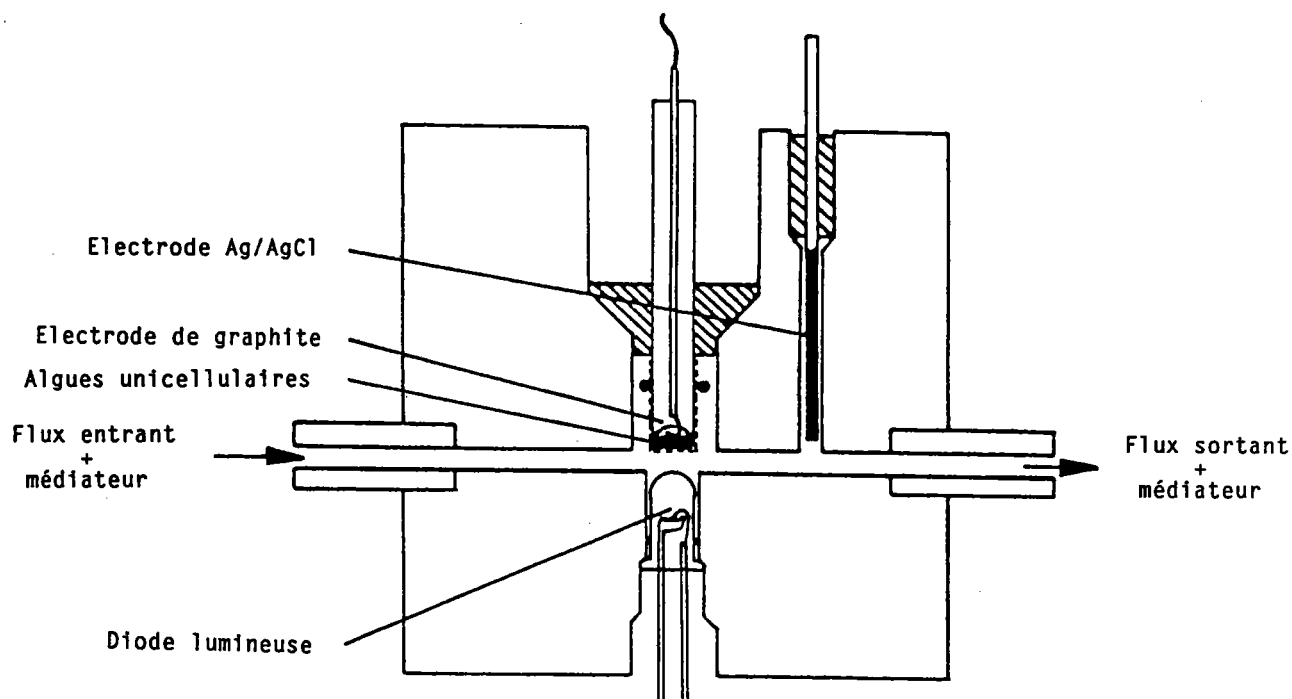


Figure 7 : Structure de l'appareillage utilisé.

Le système réalisé est un système à 2 électrodes comprenant une électrode de graphite (électrode de travail) et une électrode argent/chlorure d'argent (électrode de référence et contre électrode combinées).

Une interface programmable (ARTEK, Laverdon, Bucks, G.B.) est connectée à un micro-ordinateur (BBC Microcomputer ACORN, Cambridge, G.B.) afin d'enregistrer les courants obtenus lors de l'excitation lumineuse du biocatalyseur. L'interface maintient le potentiel constant et permet l'enregistrement en continu des courbes $I=f(t)$ pour 4 électrodes en simultané.

L'excitation lumineuse des algues unicellulaires est réalisée par l'intermédiaire d'une diode émettrice rouge possédant son maximum à 635 nm et une intensité lumineuse de 125 millicandellas. La durée et la périodicité des flashes lumineux sont définies de manière à obtenir une réponse photosynthétique d'intensité constante (Cf figure 8). La phase obscure doit être suffisamment longue pour permettre un retour à la ligne de base.

Le biocatalyseur, immobilisé par adsorption sur membrane est maintenu au contact de l'électrode de travail.

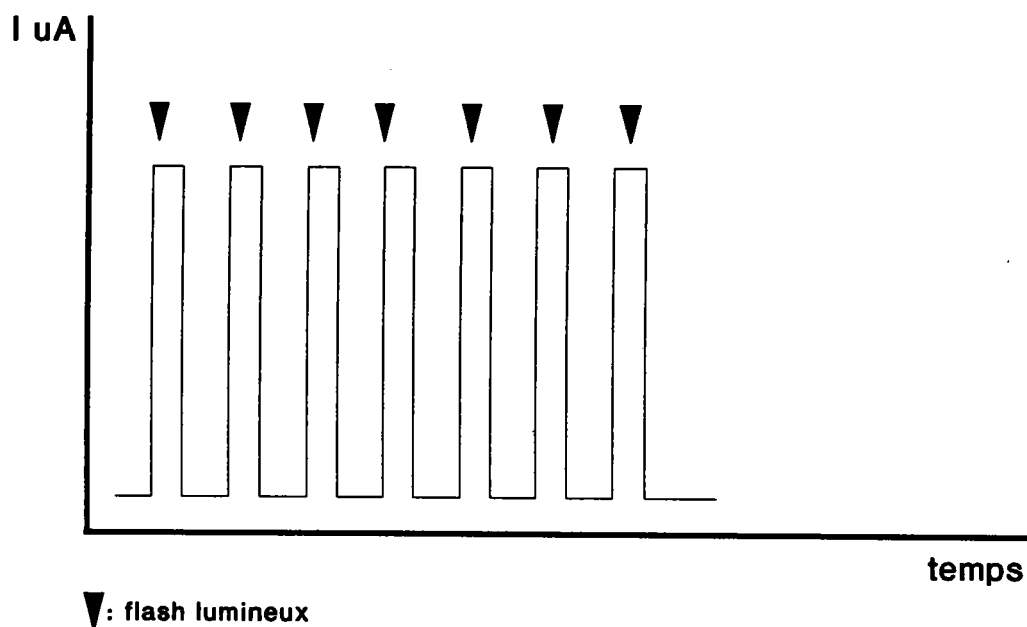


Figure 8 : Représentation schématique du courant produit par les micro-organismes immobilisés en réponse à des excitations lumineuses successives.

3.1.1.2 Electrode de graphite

Les électrodes utilisées pour les différentes expériences ont été préparées, au laboratoire, à partir de carbone PAPYEX (Le Carbone Lorraine, Gennevilliers, F.). Le protocole de fabrication suivi est détaillé annexe I.

Après chaque expérience, les électrodes sont repolies sur papier filtre.

Remarque : La fabrication manuelle des électrodes de graphite entraîne une grande variabilité de leur résistance interne. Ainsi, selon les électrodes utilisées, l'amplitude du courant mesuré en réponse à des stimuli lumineux peut varier de manière importante (pratiquement du simple au double). Les séries d'électrodes choisies ont donc des résistances internes similaires afin de pouvoir comparer l'amplitude des courants mesurés.

3.1.1.3 Electrode Ag/AgCl

Des sections de fil d'argent d'un diamètre de 1,2 mm (BDH) sont recouvertes d'un dépôt de chlorure d'argent (mode de préparation présenté annexe I).

Cette électrode Ag/AgCl représente la combinaison d'une contre électrode et d'une électrode de référence. Elle va, au cours de la réaction d'oxydo-réduction, délivrer un courant et n'est donc pas inerte. Le dépôt de chlorure d'argent va progressivement se dissoudre selon la réaction :



Ces électrodes sont réparées très régulièrement après polissage à la toile Eméri.

3.1.2 Réactif biologique

Les essais ont été réalisés principalement sur des chlorophycées représentatives des eaux douces. Les espèces choisies sont celles habituellement recommandées pour les tests d'écotoxicité en milieu hydrique :

- *Chlorella vulgaris* (CCAP 211/11b) (1),
- *Selenastrum capricornutum* (ATCC 22662) (2),
- *Scenedesmus subspicatus* (Gottingen 86-81) (3),
- *Synechococcus* (PCC 6301) (4).

Les souches (1, 2, 3.), conservées au laboratoire, sont cultivées stérilement et entretenues par repiquage hebdomadaire en milieu LEFEBVRE et CZARDA (composition détaillée annexe II). *Synechococcus* est cultivée en milieu BG 11 (RIPPKA et al., 1979).

3.1.3 Immobilisation du biocatalyseur

3.1.3.1 Adsorption sur membrane

Les algues sont immobilisées par filtration sur membrane (diamètre 5 mm identique à celui de l'électrode de graphite). Cette membrane est placée au contact de l'électrode, la face supportant les micro-organismes contre le disque de graphite. Le filtre, ainsi préparé, est maintenu en place par un filet de nylon cerclé par un anneau de caoutchouc.

Les membranes utilisées sont des membranes d'aluminium dont le diamètre des pores est de 0,2 μm (ANOTEC, Branbury, G. B.). Ces filtres sont rigides et deviennent translucides après humidification. La majeure partie de ces expériences avec médiateur a été réalisée avec un système de double membrane. La couche de cellules algales est placée en "sandwich" entre les deux membranes afin de limiter les pertes de biocatalyseur par lessivage.

Pour la préparation des électrodes, on prélève une fraction de culture algale en phase exponentielle de croissance. Cette fraction est diluée si nécessaire avec du milieu de culture stérile jusqu'à obtention d'une valeur de D.O. proche de 0,5 (D.O. mesurée à 665 nm), représentant une concentration algale de $9 \cdot 10^6$ cellules/ml, $5 \cdot 10^6$ cellules/ml, $7 \cdot 10^6$ cellules/ml respectivement pour *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus subspicatus* et *Selenastrum capricornutum*.

Chaque électrode est ensuite préparée à partir de 1 ml de cette solution ; après centrifugation (900xg pendant 3 minutes), le culot est remis en suspension dans 25 μl de milieu de culture puis filtré sur la membrane.

3.1.3.2 Inclusion dans un gel d'alginate

Chlorella vulgaris a été immobilisée dans un gel de nature polysaccharidique (alginate). Le biocatalyseur, préparé sous forme de bille d'alginate, a été appliqué à la détection de différents herbicides.

La technique de préparation des ces billes d'alginate est la suivante : une fraction de culture algale (60 ml environ) est centrifugée afin de concentrer les cellules. Le culot est récupéré et remis en suspension dans une solution d'alginate 0,5% (poids/volume). La solution,

ainsi préparée est homogénéisée puis prélevée à l'aide d'une seringue. Le mélange alginate/*Chlorella vulgaris* est versé goutte à goutte dans un bécher contenant du chlorure de calcium à une concentration de 0,1 M, entraînant la formation immédiate de billes de consistance solide. En effet l'alginate est composé d'un bloc linéaire d'un copolymère d'acide D mannuronique et L guluronique qui peut être solidifié par des ions multivalents habituellement le calcium et l'aluminium (KENNEDY et CABRAL, 1983). Ces ions jouent le rôle d'agents de réticulation.

Les billes ainsi formées sont conservées dans le CaCl_2 0,1 M pendant 1 heure à 4°C, puis rincées à l'eau distillée.

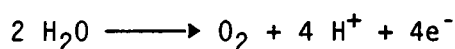
Deux processus différents de conservation de ces billes d'alginate ont été étudiés :

- remise en suspension de ces billes dans du milieu de culture (LEFEBVRE et CZARDA)
- déshydratation douce des billes d'alginate à température ambiante sous hotte à flux laminaire.

3.2 Electrode à oxygène

Les protéines et les enzymes associées au système de photolyse de l'eau sont parmi les composantes les plus fragiles de l'appareil photosynthétique. Pour cette raison il apparaît donc qu'un suivi de la production d'oxygène par les organismes photosynthétiques peut servir d'outil d'alerte pour la détection rapide des effets négatifs des polluants.

L'oxygène, lors des réactions photosynthétiques, est produit par réduction de l'eau sur la face interne de la membrane des thylacoïdes selon la réaction :



Deux molécules d'eau sont dissociées en 4 électrons (qui réduisent la tyrosine Z^+), une molécule d'oxygène et 4 protons qui vont participer à la synthèse d'ATP.

De nombreuses techniques sont utilisées pour déterminer les teneurs en O_2 dissous dans les milieux aqueux, qu'il s'agisse de méthodes chimiques, optiques ou électrochimiques. Les méthodes électrochimiques, en particulier ampérométriques, sont les plus fréquemment rencontrées. Elles se caractérisent par l'application d'une source de tension extérieure qui force la réduction de l'oxygène par imposition d'un potentiel suffisant à la cathode. Il existe une grande variété de combinaison anode-cathode utilisée pour la fabrication de ces électrodes mais actuellement la majorité des électrodes à O_2 dérivent de la sonde décrite par CLARK (1956) utilisant le couple platine-Ag/AgCl. Dans ce type de sonde, le milieu à tester est séparé du compartiment de mesure par une membrane hydrophobe perméable à l'oxygène gazeux. On évite ainsi la réaction à la cathode d'espèces électroactives qui pourraient perturber la mesure.

Des biocapteurs récents appliqués à la détection du glucose par mesure de consommation d'oxygène ont été mis au point avec des transducteurs faisant appel à la technologie des semi-conducteurs ou des fibres optiques. TRETTNAK et al. (1988) ont ainsi proposé une mesure d'oxygène par suivi de la fluorescence d'une substance colorée sensible aux variations partielles en O_2 . SUZUKI et al. (1990) ont miniaturisé un

capteur de type Clark en remplaçant l'électrolyte liquide par un gel, l'anode et la cathode étant en or.

Pour notre part nous avons réalisé une électrode à oxygène de type ouvert comportant une cathode en graphite et une électrode argent/chlorure d'argent (anode et électrode de référence combinées). Le coût de revient d'un tel capteur est très faible comparativement aux électrodes à oxygène de type Clark.

3.2.1 Principe de la mesure

L'amplitude du courant circulant entre les 2 électrodes en fonction du potentiel imposé, est déterminé par la vitesse de 2 processus consécutifs :

- la vitesse d'arrivée de l'oxygène de la solution à travers la zone de transport à la surface de la cathode,
- la vitesse et la stoechiométrie de la réduction cathodique de l'oxygène.

Pour des sondes protégées par une membrane, la zone de transport comprend l'épaisseur de l'électrolyte, de la membrane sélective et peut également inclure un film liquide à la surface externe de la membrane.

La figure 9 donne une représentation schématique des polarogrammes obtenus avec une sonde protégée par une membrane.

Le graphe (1) met en évidence 4 régions distinctes en fonction du potentiel imposé. Dans la région (a) le facteur limitant est la réduction électrochimique de l'oxygène qui ne peut avoir lieu que lorsque le potentiel de décomposition de l'oxygène a été atteint. Le courant résiduel observé est causé par un nombre d'effets autres que la réduction de l'oxygène.

Le courant mesuré dans la région (b) est déterminé pour sa part par la vitesse de transport et de réduction de l'oxygène. Une augmentation du potentiel négatif à la cathode accélère la réduction de l'O₂ jusqu'à un point où la vitesse peut être considérée comme infinie par rapport à la vitesse de transport des molécules d'oxygène à l'électrode (région (c)) :

la concentration de l'oxygène à la surface de l'électrode est nulle et tout l' O_2 qui arrive à la surface de la cathode est immédiatement réduit. Le courant mesuré est alors une fonction linéaire de la concentration de l'oxygène dans le milieu.

La région (d) se caractérise par une augmentation du courant mesuré lorsque le potentiel de décomposition de l'eau a été atteint. Cette augmentation de courant est causée par un dégagement d'hydrogène (LINEK et al., 1988).

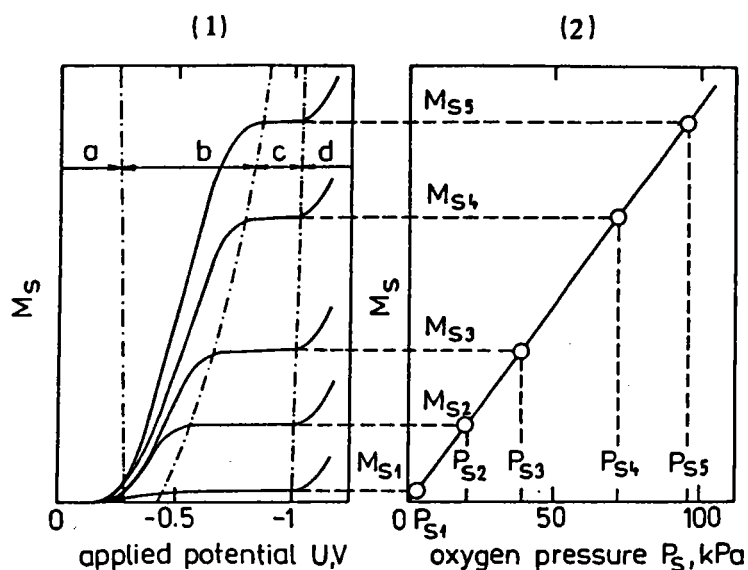
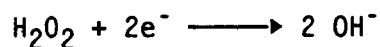
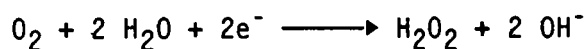


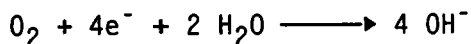
Figure 9 : Polarogrammes obtenus avec une sonde recouverte d'une membrane pour différentes concentrations en oxygène (d'après LINEK et al., 1988).

La réduction de l'oxygène au niveau d'une cathode métallique s'effectue selon 2 mécanismes possibles :

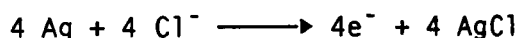
* le premier comporte 2 réactions successives mettant chacune en jeu 2 électrons (1),



* le second met en jeu une seule réaction à 4 électrons, qui représente la réaction totale à la cathode (2).



La réaction anodique est fonction de la nature de l'électrolyte. Dans les essais réalisés, se produit la réaction suivante :



Quatre électrons sont produits pour chaque molécule d'oxygène réduite.

DAMJANOVIC (1969) rapporte que la réduction de l'oxygène est prédominante avec la réaction (2) pour des valeurs faibles de pH de l'électrolyte. Une augmentation de pH de la solution favorise le schéma réactionnel (1) ; lequel devient prédominant dans des milieux alcalins.

N.B.: L'influence de la géométrie et de la taille de la cathode sur le signal mesuré n'ont pas été prise en compte. De même nous n'avons pas approfondi le comportement de H_2O_2 à l'électrode, à savoir si la réduction était complète ou s'il se produisait une diffusion partielle dans le milieu.

D'une manière générale nous avons négligé la majeure partie des facteurs physiques pouvant influencer sur le courant produit ; le but de ce travail étant uniquement la mise au point d'un capteur permettant de suivre l'oxygène photosynthétique produit par des algues unicellulaires pour la détection des polluants.

3.2.2 Appareillage

L'appareillage utilisé (cellule électrochimique et dispositif d'enregistrement) est identique à celui décrit paragraphe 3.1.1. Ce système permet de quantifier la production d'oxygène résultant d'une excitation lumineuse d'algues unicellulaires immobilisées.

Le potentiel imposé entre les 2 électrodes est maintenu constant à une valeur suffisamment négative pour permettre la réduction de la totalité de l'oxygène produit. Le courant résultant est proportionnel à la quantité d'oxygène dégagé.

3.2.3 Membrane protectrice, électrolyte

Différentes expériences ont été effectuées en l'absence ou présence d'une membrane protectrice de Téflon au niveau de la cathode. Cette membrane a été obtenue auprès du laboratoire de chimie du "Luton College of Higher Education".

L'influence de la membrane ainsi que le choix de l'électrolyte seront discutés ultérieurement en fonction des expériences réalisées.

3.2.4 Réactif biologique, Immobilisation

Les espèces algales sont identiques à celles utilisées pour le système à médiateur. Mais nous avons également testé d'autres espèces comme biocatalyseur :

- *Dunaliella bioculata*,
- *Phaeodactylum tricornutum*, Niva Bac 1
- *Skeletonema costatum*, G.B. 1077-3

La technique d'immobilisation des micro-organismes par adsorption sur membrane reste inchangée. Des membranes de structures différentes ont été testées comme support de fixation de ces espèces algales.

3.3 Expression des résultats

Les pourcentages d'inhibition d'activité photosynthétique, pour les différentes expériences réalisées, sont calculés pour chaque électrode par rapport au courant mesuré avant addition du toxique. Celui-ci est ajouté lorsque la réponse du capteur est stable.

Ces expériences ont néanmoins été effectuées en présence d'un témoin afin de contrôler la diminution éventuelle de réponse durant la période d'exposition du biocapteur au toxique. Les pourcentages d'inhibition intègrent donc la diminution du témoin selon la formule :

$$I\% = \frac{(I_0 \times A) - I_t}{(I_0 \times A)}$$

I_0 : courant avant addition du toxique,

I_t : courant mesuré au temps t après addition du toxique,

$$A = \frac{I_t}{I_0} \text{ pour le témoin.}$$

Les résultats présentés dans les tableaux de résultats correspondent à la moyenne de 3 électrodes.

3.4 Tests algues

Une série de tests algues a été effectuée afin de comparer les performances des bioélectrodes algales par rapport aux tests en conditions statiques. Les critères suivants ont été retenus pour ces essais :

- numération 1 à 5 10^5 cellules /ml,
- température $22^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$,
- lumière 2200 ± 200 lux,
- éclairage continu,
- milieu de culture LEFEBVRE et CZARDA (annexe II),
- durée du test : 72 heures,
- agitation rotative horizontale de 150 tr/min.

L'évaluation de la croissance algale a été estimée par comptage cellulaire (cellule de Malassez ou de Thoma) en effectuant simultanément une mesure de densité optique à 665 nm ou une mesure de fluorescence de la suspension algale (438 nm - 682 nm). Les essais ont été réalisés en triplicat.

CHAPITRE 4

RESULTATS : SYSTEME A MEDiateUR

- Optimisation du système
- Sensibilité du système

4.1 Optimisation du système

4.1.1 Choix du médiateur

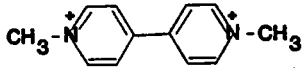
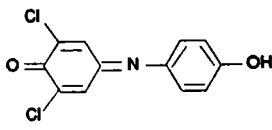
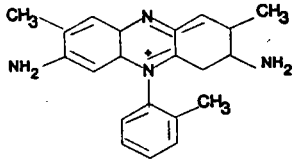
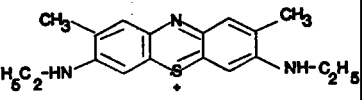
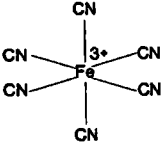
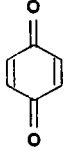
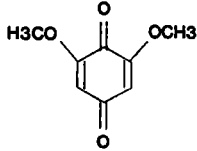
Une série de médiateurs a été testée afin de mesurer l'intensité du transfert électronique au sein des chloroplastes d'algues unicellulaires. Les résultats obtenus, pour ces différentes espèces, sont résumés dans le tableau III.

Seuls la *p*-benzoquinone et le 2,6-diméthylbenzoquinone ont donné des résultats exploitables avec *Chlorella vulgaris* et *Scenedesmus subspicatus*. Les essais effectués sur *Selenastrum capricornutum* avec la *p*-benzoquinone ont certes permis de quantifier l'activité photosynthétique des cellules algales immobilisées mais l'amplitude du courant obtenu était beaucoup plus faible que pour les 2 autres chlorophycées et insuffisante, en tout cas, pour pouvoir être exploitée dans un essai de toxicité.

Des médiateurs tel que le méthylviologène et le 2,6-dichlorophénol, utilisés pour mesurer l'importance du transfert électronique dans le chloroplaste respectivement au niveau du PS I et PS II (MIMEAULT et CARPENTIER, 1988 ; FROMME et RENGIER, 1990), n'ont pas permis de suivre l'émission d'électrons photosynthétiques pour les espèces eucaryotes testées (excepté une très faible réponse pour le méthylviologène avec *Chlorella vulgaris*).

L'inactivité de ces médiateurs pourrait s'expliquer par la structure du matériel biologique choisi. Ces produits sont, en effet, fréquemment étudiés sur des chloroplastes isolés alors que pour notre part, nous avons retenu la cellule dans son entier. La présence de la paroi algale serait responsable de l'absence de réactivité de ces composés car elle fait obstruction à la pénétration de ces produits dans la cellule.

Tableau III : Efficacité des différents médiateurs pour la mesure de l'intensité du transfert d'électrons.

Médiateur (origine)	Formule chimique développée	Pot. st. Eo(V)	Espèces testées	Conc. testées	Réponse obtenue
Paraquat dichlorure (Methyl- viologène) (1)		- 0.446	<i>Chlorella</i> <i>Scenedesmus</i> <i>Synechoc.</i>	0,1 0,3 0,5 1,0mM	* - *
2,6-dichlorophénol indophénol DCPIP (1)		+ 0.217	<i>Chlorella</i> <i>Selenastrum</i> <i>Synechoc.</i>	0,1 0,2 0,3 0,5mM	- - **
Safranine 0 (1)		- 0.289	<i>Chlorella</i> <i>Scenedesmus</i> <i>Synechoc.</i>	0,2 0,5 1,0mM	- - -
New methylene blue (NMB) (1)		- 0.021	<i>Chlorella</i>	0,05 0,1mM	-
Ferri- cyanure de potassium (2)		+ 0.360	<i>Chlorella</i> <i>Selenastrum</i> <i>Scenedesmus</i>	5,0mM	- - -
p-benzo quinone (3)		+ 0.040	<i>Chlorella</i> <i>Selenastrum</i> <i>Scenedesmus</i>	0,1 0,2 0,3mM	*** ** ***
2,6-diméthyl benzo quinone (3)			<i>Chlorella</i>	0,2 0,4 0,5mM	***

(1) :provenance laboratoire de chimie Luton College of Higher Education

(2) :produit Merck

(3) :produits Aldrich

- :aucune réponse mesurée

* :réponse infime

** :faible réponse

*** :amplitude de réponse importante

Ces essais montrent également l'impossibilité d'accession des molécules de ferricyanure de potassium, utilisé comme accepteur artificiel d'électrons des photosystèmes I et II (SYNKOVA et SESTAK, 1989), au niveau des chloroplastes d'algues eucaryotes. Ce médiateur est, par contre, utilisé pour le suivi des électrons le long de la chaîne photosynthétique chez les cyanobactéries (RAWSON et al., 1987, 1989). GAISFORD et al. (1991) indiquent que $\text{Fe}(\text{CN})_6$, chez ces procaryotes, ne pénètre pas au sein de la cellule, mais est supposé capter les électrons au niveau des déshydrogénases liées à la membrane plasmique.

Les médiateurs de la famille des benzoquinones sont, en revanche, des composés à caractère lipophile qui pénètrent dans les cellules pour accéder aux chloroplastes. Ces composés sont considérés comme agissant sur la chaîne de transfert électronique du PS II au niveau des quinones. LAVERGNE (1982) a en effet mis en évidence, sur des chloroplastes d'épinard, que la *p*-benzoquinone se réduisait en captant les électrons de Q_B (second accepteur des quinones au sein du PS II). Des travaux de TANAKA-KITATANI et al. (1990), réalisés sur des préparations de PS II de *Synechococcus elongatus*, ont démontré que les dérivés halogénés des benzoquinones se réduisaient en captant principalement les électrons de Q_B mais également du premier accepteur Q_A . RENGIER et collaborateurs (1988), pour leur part, ont déterminé le site d'action de la phényl-*p*-benzoquinone et la tribromotuloquinone respectivement au niveau de Q_A de manière covalente et au niveau de Q_B de manière non covalente.

La *p*-benzoquinone a été choisie comme médiateur, préférentiellement au 2,6-diméthyl-benzoquinone, qui produit un courant d'amplitude plus faible, toutes conditions étant égales par ailleurs. La concentration retenue pour les essais est de 0,2 mM (soit 21,6 mg/l) valeur permettant d'obtenir une réponse mesurable des électrodes sans enregistrer de perturbations dans le tracé (figure 10).

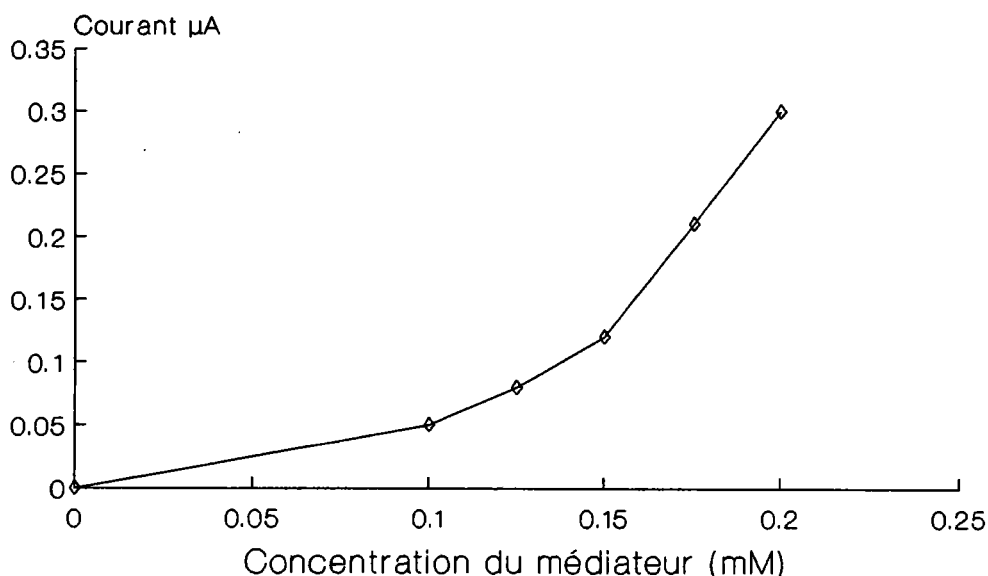


Figure 10 : Amplitude du courant mesuré pour une électrode utilisant *Chlorella vulgaris* en fonction de différentes concentrations de médiateur (*p*-benzoquinone).

La figure 10 indique qu'il n'y a pas de relation linéaire entre la concentration de *p*-benzoquinone en solution et l'amplitude du courant mesuré (choix des pulsations lumineuses pour cette expérience 10min/10min).

Les expériences réalisées ont montré qu'une période d'illumination des micro-organismes de 10 à 15 minutes était nécessaire pour l'obtention d'une réponse d'intensité constante.

4.1.2 Propriétés de la *p*-benzoquinone

4.1.2.1 Propriétés chimiques

Ce produit se présente sous forme de cristaux jaunes. Sa solubilité dans l'eau est relativement faible.

A la lumière, la couleur de la solution de 1,4-benzoquinone se modifie rapidement par suite d'une altération de sa structure. ONONYE et collaborateurs (1986) indiquent que cette photodégradation entraîne la production de radicaux semiquinones intermédiaires ($\text{BQH}\cdot$) ; les produits finaux de réaction étant l'hydroquinone ou la 2-hydroxy-*p*-benzoquinone.

Afin de remédier à cet inconvénient, le récipient contenant le milieu circulant ainsi que le bloc de Plexiglas, où sont logées les électrodes, sont placés à l'obscurité afin d'éviter cette altération du médiateur.

4.1.2.2 Toxicité

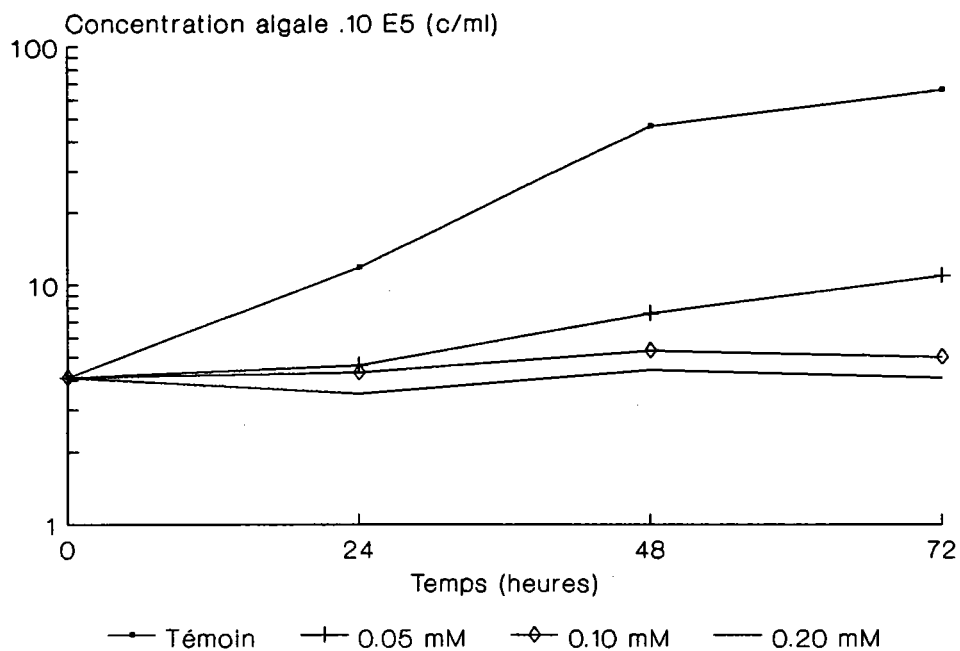
La nécessité d'utiliser une concentration de médiateur élevée nous a conduit à étudier les effets de la *p*-benzoquinone sur les algues eucaryotes. RAWSON et al. (1987) ont en effet montré que la durée de vie d'un biocapteur à cyanobactéries utilisant la *p*-benzoquinone à la concentration de 0,5 mM était limitée à 24 heures, alors qu'elle était de 6 jours avec le ferricyanure de potassium.

VERSCHUEREN (1983) rapporte qu'une concentration de 6 mg/l de *p*-benzoquinone est toxique pour *Scenedesmus subspicatus*, et qu'une concentration inférieure à 1 mg/l est toxique pour les cyanobactéries.

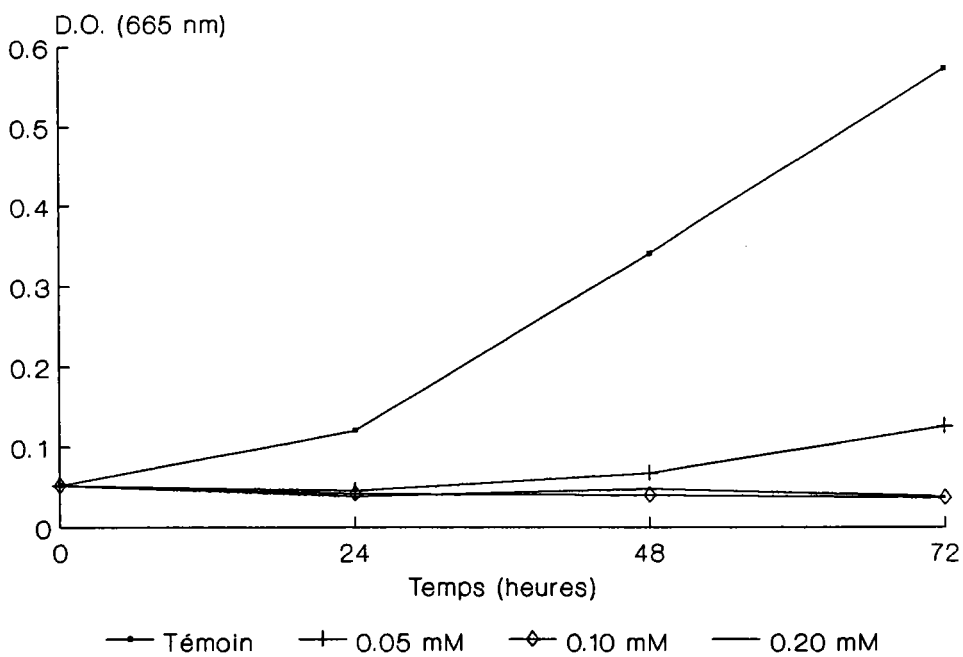
Afin d'évaluer la toxicité de ce médiateur nous avons réalisé un essai statique d'inhibition de croissance de cultures de *Chlorella vulgaris* soumises à 3 doses de *p*-benzoquinone : 0,05 mM, 0,1 mM et 0,2 mM (soit 5,4 10,8 et 21,6 mg/l).

Etant donné la modification de couleur de la solution de *p*-benzoquinone à la lumière, nous avons réalisé un témoin coloration contenant uniquement le toxique aux diverses concentrations dans le milieu LEFEBVRE et CZARDA. La couleur des milieux intoxiqués passe rapidement du jaune au rose puis au brun.

L'inhibition de croissance algale est pratiquement totale dès 24 heures même pour la plus faible dose de toxique considérée, que l'on se réfère à la numération cellulaire ou à la mesure de la densité optique à 665 nm pour évaluer la toxicité (figure 11).



NUMERATION A LA CELLULE DE MALASSEZ



DENSITE OPTIQUE à 665 nm

Figure 11 : Essai d'inhibition de croissance pour la *p*-benzoquinone (espèce algale utilisée : *Chlorella vulgaris*)

4.1.3 Durée de vie du biocapteur

La durée de vie du biocapteur conditionne l'intérêt et l'applicabilité d'un système de contrôle de toxicité en continu. Le capteur à *Chlorella vulgaris* avec 0,2 mM de *p*-benzoquinone a été testé sur une période de 24 heures : l'alternance phase lumineuse/phase obscure est de 10 min/10 min, le milieu circulant utilisé étant le milieu LEFEBVRE et CZARDA.

L'évolution de la réponse du capteur en fonction du temps est représentée figure 12(a). Cette expérience a été effectuée sur 4 électrodes simultanément.

Le tracé obtenu montre que l'amplitude du courant passe par un maximum puis décroît ensuite régulièrement. Après 10 heures d'expérience la réponse n'est plus égale qu'à 50% de la réponse maximale. A 16 heures la diminution est supérieure à 80%. Après 24 heures l'activité photosynthétique est nulle. La décroissance observée est du même ordre pour les 4 électrodes testées.

Au terme de cet essai, le système est rincé à l'aide de milieu LC puis, on fait circuler de nouveau de la *p*-benzoquinone fraîchement préparée à la même concentration. Le tracé reste inchangé ; cette diminution de la réponse n'est donc pas causée par une perte d'activité du médiateur due à la photodégradation. Cette expérience rejoint les travaux de RAWSON *et al.* (1987) qui ont observé une faible durée de vie de leur biocapteur à cyanobactéries avec ce médiateur.

Dans le but de prolonger la vie de ce biocapteur, nous avons réalisé le même type d'expérience, mais de manière séquentielle. Le biocapteur est opérationnel pendant 4 heures, puis pendant les 4 heures suivantes, le milieu LC seul va circuler. Ce fonctionnement s'apparente à un fonctionnement en semi-continu. La courbe $I=f(t)$ obtenu lors de cette expérience est présentée figure 12(b). L'application du médiateur en semi-continu ne modifie pas la diminution de la réponse observée (Cf graphes 12(a) et 12(b)). Les périodes de régénération en milieu LC ne ralentissent aucunement la diminution de l'activité photosynthétique.

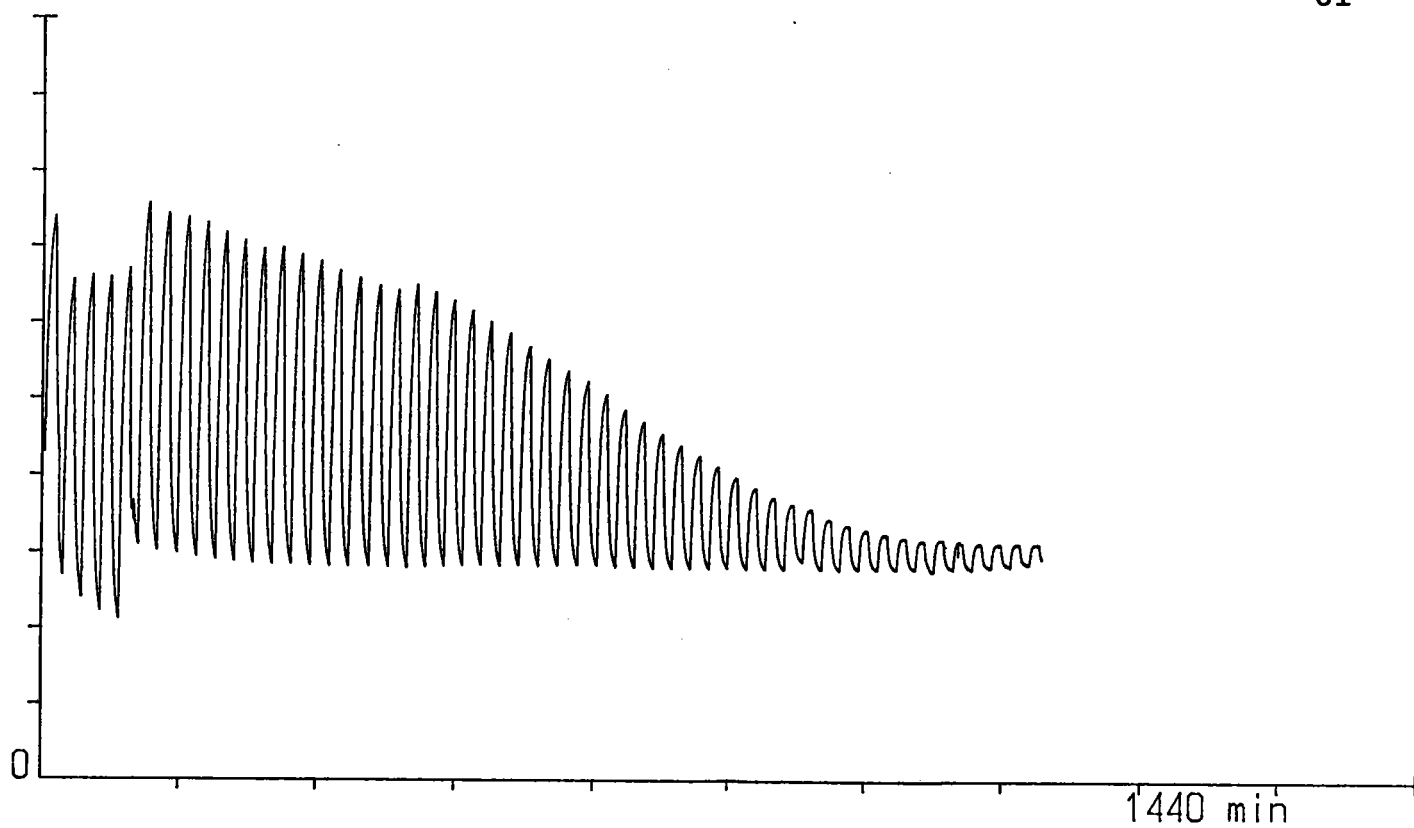


Figure 12(a) : Réponse du capteur avec *Chlorella vulgaris* - Evolution de la réponse au cours du temps (*p*-benzoquinone en continu).

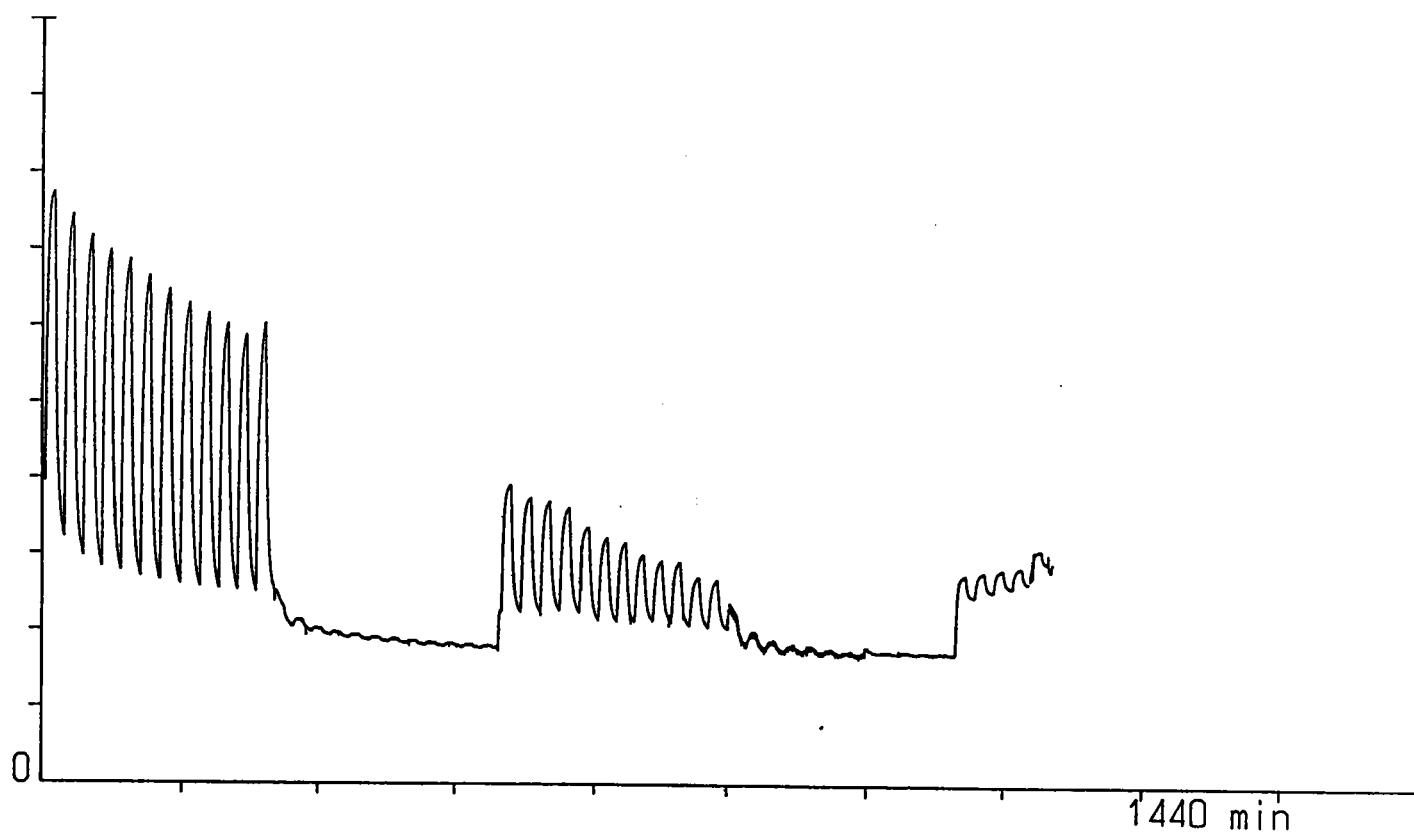
2 μA 

Figure 12(b) : Réponse du capteur avec *Chlorella vulgaris* - Evolution de la réponse au cours du temps (*p*-benzoquinone et NaCl en alternance).

4.2 Sensibilité du système

4.2.1 Toxicité des herbicides

4.2.1.1 Biocapteur immobilisé par adsorption sur membrane

La sensibilité de ces bioélectrodes à *Chlorella vulgaris* a été testée sur une série d'herbicides malgré une toxicité élevée du médiateur qui limite la durée de vie du biocapteur. La plupart de ces essais a été effectuée avec une alternance phase lumineuse/phase obscure de 15 min/15 min. L'herbicide a été ajouté seulement lorsque le courant mesuré était stabilisé.

Ces expériences ont été réalisées en présence d'un témoin afin de contrôler la diminution éventuelle de la réponse de l'électrode durant la période d'exposition du biocapteur au toxique. Cette diminution est toujours restée faible, comprise entre 0 et 5%. L'influence des solvants utilisés pour solubiliser les substances étudiées s'est révélée négligeable.

Les résultats de toxicité obtenus et exprimés en pourcentages d'inhibition d'activité photosynthétique sont donnés tableau IV.

Ces résultats indiquent une toxicité élevée des urées substituées, des triazines et acylanilides. La limite de détection de ces produits dans les eaux se situe dans une gamme de concentration comprise entre 0,010 et 0,050 mg/l. *Chlorella vulgaris* s'est révélée moins sensible à l'action du bromoxynil. La toxicité du pentachlorophénol (inhibiteur de la phosphorylation oxydative) se situe dans une gamme de concentrations identique à celle du bromoxynil. Aucune détection n'a été possible pour le MCPA, le mécoprop (MCP) et le paraquat dichlorure.

Les urées substituées, triazines et acylanilides sont connus pour inhiber le transfert d'électrons du PS II au sein des chloroplastes. Ces composés se fixent au niveau de la sous unité protéique D1 et bloquent le transfert d'électrons entre Q_A et Q_B (VAN RENSEN, 1982 ; TREBST, 1987 ; METS et THIEL, 1989). Le propanil posséderait aussi la propriété de découpler la phosphorylation oxydative (MORELAND et al., 1981). Cette double action (découplante et inhibitrice du transfert d'électrons) est également caractéristique du bromoxynil (CORBETT et al., 1984).

Tableau IV : Pourcentages d'inhibition du flux d'électrons photosynthétiques observés (avec écarts-types correspondants) pour des additions de différentes substances herbicides.

Famille d'herbicides testés	Produits considérés	Pourcentage inhibition	Durée expo.	Solvants ^a utilisés
Urées Substituées	DCMU ^b 0,200 mg/l	68(±4)	10 min	Ethanol 25%
	DCMU ^b 0,200 mg/l	95(±2)	30 min	
	Chlortoluron 0,025 mg/l	23(±1) 23(±1)	30 min 60 min	Acétone 2%
	Chlortoluron 0,050 mg/l	40(±2) 41(±2)	30 min 60 min	
	Isoproturon ^c 0,050 mg/l	15 29	30 min 60 min	Méthanol 1%
Triazines	Atrazine 0,050 mg/l	18(±3) 19(±3)	30 min 60 min	Méthanol 3%
	Atrazine 0,100 mg/l	32(±4) 41(±4)	30 min 60 min	
Acylanilides	Propanil 0,010 mg/l	9(±2) 11(±2)	30 min 60 min	Méthanol 1%
Benzonitriles	Bromoxynil ^c 2 mg/l	23 27	30 min 60 min	Acétone 5%
Composés Organochlorés	Pentachlorophénol 1 mg/l	12(±3) 18(±3)	30 min 60 min	Acétone 100%
	Pentachlorophénol 3 mg/l	38(±8) 47(±4)	30 min 60 min	
Acides Phénoxy-alcanoïques	MCPA 2 mg/l	0 0	30 min 60 min	Ethanol 1%
Acides Phénoxy-propioniques	Mécoprop 2 mg/l	0 0	30 min 60 min	Méthanol 1%
Composés Hétérocycliques	Paraquat di-chlorure 10 mg/l	0 0	30 min 60 min	Méthanol 1%

(a) : les teneurs en solvants indiqués dans le tableau correspondent aux concentrations utilisées pour la préparation des solutions mères de toxiques.

(b) : pulsations 5 min/5 min

(c) : le pourcentage d'inhibition est calculé pour 2 électrodes

Les formules développées des herbicides testés sont présentées annexe III.

La sensibilité moindre de l'action du bromoxynil en comparaison de celle des urées substituées, triazines et acylanilides avait déjà été observée par KRATKY et WARREN (1971b) chez *Chlorella Pyrenoidosa*.

La non détection des additions de MCPA, mécoprop et paraquat étaient en partie prévisibles étant donné que ces composés n'agissent pas au niveau du photosystème II. MCPA et Mécoprop entraînent des aberrations de la croissance et du métabolisme des acides nucléiques (HASSAL, 1982), et le paraquat est connu comme accepteur d'électrons du PS I au niveau de la ferrédoxine (MORELAND, 1980 ; KUNERT et DODGE, 1989).

4.2.1.2 Biocatalyseur inclus dans un gel d'alginate

Les billes d'alginate sont maintenues au contact de l'électrode de graphite par un filet de nylon qui recouvre l'ensemble du système membrane-électrode. L'amplitude de la réponse obtenue est importante. Elle ne peut être valablement comparée avec celle d'une électrode dont les algues sont immobilisées sur filtre car l'estimation de la concentration algale dans le gel s'avère difficile. La forme des pics obtenus est différente ; pour le temps de pulsation choisi (10 min/10 min) le courant mesuré est constant. Une addition de 25 mM de CaCl_2 entraîne une augmentation de 25% de l'amplitude du courant mesuré, et accélère encore la réponse.

Il est intéressant de noter que le chlorure de calcium n'avait pas d'action sur des cellules algales immobilisées par adsorption.

La sensibilité de ces bioélectrodes a été évaluée pour 3 herbicides. Les résultats sont présentés tableau V.

Tableau V : Essais de toxicité réalisés avec le biocatalyseur inclus dans un gel d'alginate

Herbicide testé (mg/l)	Billes d'alginate conservées dans le LC			Billes d'alginate deshydratées		
	Pourcent. inhibition	Durée exposition	Temps conserv.	Pourcent. inhibition	Durée exposition	Temps conserv.
Linuron 0,010	17(±2) 16(±3)	20 min 40 min	2h. 2h.	- -		
DCMU 0,005	16(±3) 23(±4)	20 min 40 min	1j. 1j.	- -		
Propanil 0,010	11(±1) 16(±1)	20 min 40 min	5j. 5j.	10(±1) -	20 min	2j.

Les pourcentages d'inhibition obtenus témoignent d'une grande sensibilité du biocapteur pour ces produits. Le gel d'alginate ne semble pas s'opposer au passage du médiateur et des herbicides de type organique.

Les résultats obtenus avec une addition de 0,010 mg/l de propanil sont très similaires à ceux obtenus précédemment avec les algues adsorbées sur membrane d'aluminium.

Des essais ont été réalisés avec les billes d'alginate séchées puis réhydratées en présence de citrate trisodique (5 mM pendant quelques minutes) ou en milieu LC (le sodium déplace l'équilibre de formation du complexe alginate-Ca vers la formation d'un complexe alginate de sodium qui est soluble dans l'eau. Un temps de contact trop long conduit à une désagrégation totale des billes d'alginate).

Un ajout de 0,010 mg/l de propanil a entraîné, pour des billes conservées 2 jours à sec avant réhydratation, un pourcentage d'inhibition voisin de celui obtenu pour des billes non deshydratées (Cf tableau V). Aucune réponse n'a été mesurée pour des billes conservées à sec pendant 4 jours.

A la vue de ces résultats, il semble donc que le gel d'alginate ne représente pas une barrière ni pour le médiateur ni pour les toxiques organiques, mais que la conservation du biocatalyseur ne puisse se faire par deshydratation.

4.2.2 Toxicité des métaux

La sensibilité du biocapteur au cuivre, cadmium et au mercure a été testée pour des concentrations en métal de l'ordre du mg/l et pour des durées d'exposition de 1 heure.

Tableau VI : Résultats obtenus pour les différents métaux testés (concentrations exprimées en mg/l de l'ion métallique)

Sel métallique	Conc. (mg/l)	Espèces testées	Pourcentage inhibition
$\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	2	<i>Chlorella</i> <i>Scenedesmus</i>	0 0
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	5	<i>Chlorella</i>	0
$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	5	<i>Chlorella</i> *	0
HgCl_2	2	<i>Chlorella</i>	0

* : médiateur utilisé 2,6-diméthylbenzoquinone (0,4 mM)

Les résultats obtenus ont montré que le biocapteur était insensible à la toxicité de ces métaux, même à fortes concentrations (Cf tableau VI).

Ces résultats négatifs pour une addition de Cu^{2+} sont surprenants car ce composé est reconnu pour posséder une action inhibitrice sur le système photosynthétique.

Divers sites d'inhibition du transport d'électrons photosynthétiques ont été proposés, au niveau des photosystèmes I et II notamment plastocyanine et ferrédoxine (MOHANTY et al., 1989). Pour leur part, ces auteurs ont démontré que le cuivre affecte le transport d'électrons au niveau du second accepteur Q_B sur des thylacoïdes de *Pisum sativum*. RENGANATHAN et BOSE (1989) ont déterminé le site d'action du cuivre au niveau du centre réactionnel du PS II pour des chloroplastes de *Pisum sativum*.

En revanche SHIOI et al. (1978) ont trouvé un double site d'action du cuivre. Celui-ci agirait prioritairement sur la ferrédoxine et pour une faible part au niveau du site oxydant du PS II.

Nos résultats laissent à penser que le cuivre n'agit pas sur le second accepteur des quinones Q_B comme suggéré par MOHANTY et al. (1989). En effet ce site d'action est très proche de celui des herbicides : urées substituées, triazines et acylanilides (VAN RENSEN, 1982 ; DUCRUET et al., 1990) dont l'action est immédiatement détectée (Cf paragraphe 4.1.2.1). Le cuivre agirait donc plus loin le long de la chaîne photosynthétique peut-être au niveau de la plastocyanine ou de la ferrédoxine ; à moins que cette absence de toxicité résulte d'un problème de biodisponibilité, Cu^{2+} n'ayant pas pu accéder à la membrane chloroplastique.

L'absence de toxicité du cadmium et du mercure était attendue compte tenu de leurs sites d'action sur la photosynthèse. En effet, KOJIMA et al. (1987) ont rapporté que le mercure inhibe le transfert d'électrons du photosystème I au niveau de la ferrédoxine. Le site d'action du cadmium se situe au niveau du cycle de Calvin (WEIGEL, 1985), et n'a donc pas d'action sur la chaîne de transfert électronique.

Ces 2 composés sont supposés agir au delà du site d'action présumé du médiateur, ceci peut expliquer qu'ils ne sont donc pas détectables avec ce système.

4.3 Conclusions concernant les essais avec médiateurs

Le flux électronique consécutif à une stimulation lumineuse chez les algues eucaryotes ne peut être mesuré que si l'on utilise des médiateurs qui vont pénétrer dans la cellule et agir comme accepteurs terminaux d'électrons. Les essais ont montré que seuls les dérivés de la benzoquinone permettaient de mesurer l'activité photosynthétique de ces algues unicellulaires.

Ces dérivés, à la concentration utilisée, se sont révélés toxiques pour les cellules. La durée de vie d'un tel biocapteur est donc très courte. La réponse photosynthétique de *Chlorella vulgaris* n'est, en effet, plus mesurable après 24 heures d'utilisation.

L'application d'un capteur à médiateur, utilisant des algues eucaryotes, pour le contrôle des milieux hydriques n'est donc pas réalisable compte tenu de sa faible durée de vie. Les manipulations et le remplacement des électrodes algales seraient trop fréquents pour que ce capteur présente un intérêt comme système d'alerte.

CHAPITRE 5

RESULTATS : BIOCAPTEUR A OXYGENE

Milieu dulcaquicole

- Optimisation du système
- Sensibilité du système
 - * Substances chimiques
 - * Effluents industriels

Milieu marin

L'application de ce système à médiateur pour le contrôle de toxicité des eaux n'a pas été retenu étant donné sa faible durée de vie. Nous nous sommes donc intéressés à la mesure de l'oxygène comme indicateur de l'activité photosynthétique de ces algues unicellulaires au lieu du transfert d'électrons.

Le système mis au point pour la détection de l'oxygène photosynthétique comporte une électrode à O_2 de type ouvert avec une cathode en graphite et une anode en argent recouverte d'un dépôt de chlorure d'argent combinée à une électrode de référence.

Des études préliminaires ont montré que cette configuration pouvait se prêter à la mesure de l'oxygène produit par des algues unicellulaires immobilisées.

5.1 Optimisation du système

Les différents paramètres intervenant dans la conception de ce biocapteur ont été pris en compte et étudiés afin d'obtenir un signal courant d'amplitude maximale, une sensibilité optimale aux toxiques et de limiter les interférences dans les mesures.

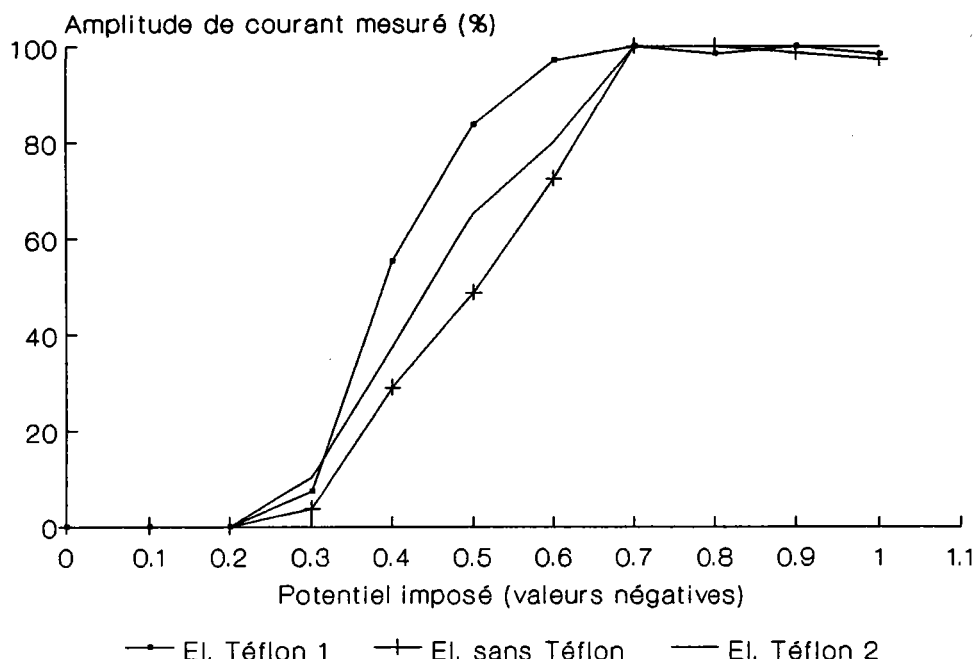
5.1.1 Paramètres physiques du système

5.1.1.1 Potentiel imposé

Nous avons testé l'influence du potentiel imposé aux bornes de l'anode et de la cathode. Celle-ci est polarisée négativement pour permettre la réduction de l'oxygène.

Les expériences ont été réalisées avec des électrodes protégées ou non par une membrane de Téflon ; l'électrolyte choisi était le NaCl à une concentration de 0,85%.

Ces essais ont montré que l'amplitude de la réponse des bioélectrodes à une excitation lumineuse variait en fonction de la différence de potentiel imposée (Cf figure 13).



Expérience réalisée pour 0,85% en NaCl

Figure 13 : Influence du potentiel imposé sur l'amplitude du courant mesuré.

Les polarogrammes obtenus présentent 3 zones distinctes. Entre 0 et -200 mV, le tracé est plat. Le potentiel de décomposition de l'oxygène n'a pas été atteint. Dans la zone 2 (-200 mV à -700 mV) le courant de réduction mesuré augmente en fonction du potentiel. Au delà de -700 mV, l'amplitude du courant est indépendante du potentiel imposé.

Le tracé est pratiquement identique pour une cathode protégée ou non par une membrane de Téflon.

Nous nous sommes placés, pour les expériences ultérieures, à une valeur de -700 mV qui permet d'obtenir un courant maximal de réduction de l'oxygène.

5.1.1.2 Choix de l'électrolyte

La configuration de l'électrode à oxygène de type ouvert rend nécessaire l'addition d'un électrolyte dans le milieu circulant. La composition de l'électrolyte doit permettre les réactions d'oxydo-réduction anodique et cathodique en transportant les ions requis entre l'anode et la cathode. La réaction anodique va donc être fonction de la nature de l'électrolyte (SIMON, 1989).

Une bonne conductivité électrique nécessite le plus souvent l'utilisation de substances inorganiques simples (LINEK et al., 1988).

Différents électrolytes ont été testés : NaCl, KCl, NH_4Cl , CaCl_2 et KBr à des concentrations s'échelonnant entre $5 \cdot 10^{-3}$ et $2 \cdot 10^{-1}$ M.

L'utilisation de NaCl, KCl, NH_4Cl et KBr a permis d'obtenir un courant maximal de réduction de l'oxygène. CaCl_2 , pour sa part, a produit des amplitudes de courant plus faibles (inférieures de moitié environ).

La présence d'ions Cl^- dans l'électrolyte conduit à la réaction d'oxydation à l'anode :



Dans le cas où KBr est utilisé comme électrolyte, les ions Br^- vont réagir de manière identique aux ions chlorures.

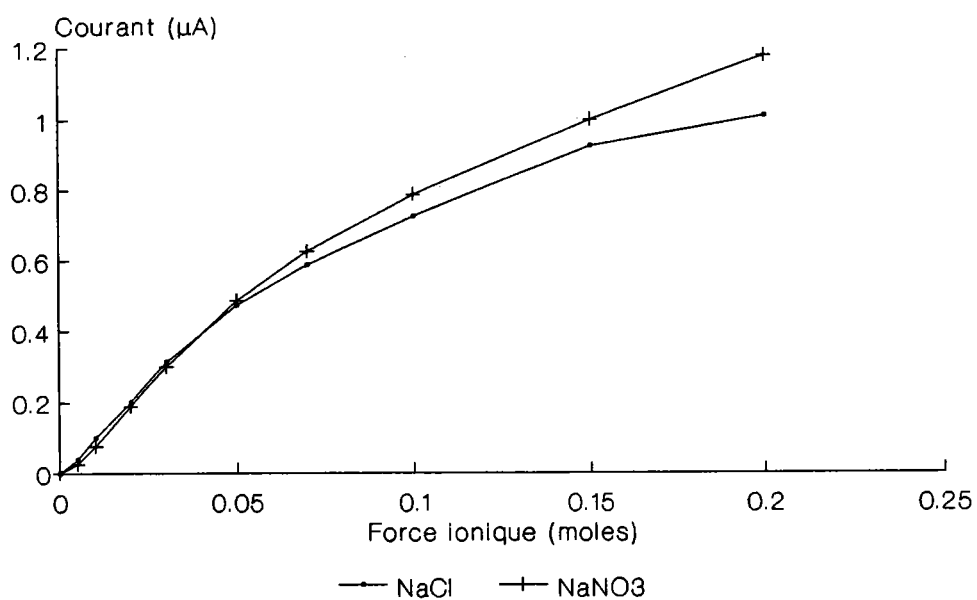
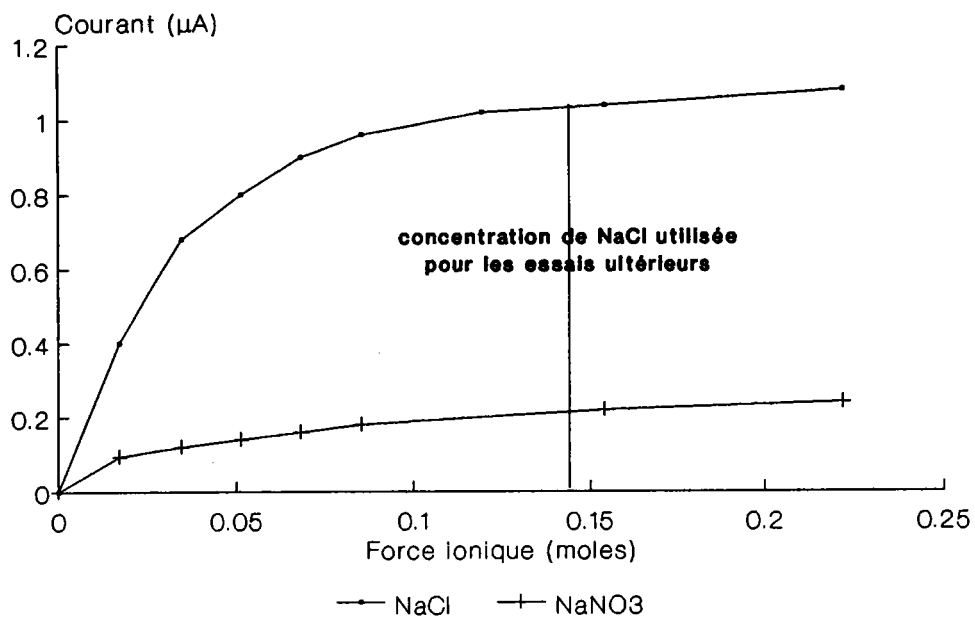
En revanche, lorsque des composés comme NaNO_3 , NH_4NO_3 ou MgSO_4 ont été utilisés, les courants enregistrés étaient très faibles ; ces amplitudes ont augmenté avec l'addition d'un pont salin (KCl 3M) au niveau de l'anode pour la séparer du flux circulant. A force ionique identique, les courants étaient équivalents (Cf figure 14).

Nous avons donc choisi le NaCl à une concentration de 0,85% ($1,45 \cdot 10^{-1}$ M) comme électrolyte ; l'amplitude du courant obtenue est alors maximale (Cf figure 14). Cette concentration est inférieure à celle de 1 M préconisée par HITCHMAN (1978) pour créer un bon milieu conducteur entre l'anode et la cathode dans le cas d'électrodes à O_2 de type Clark.

5.1.1.3 Influence de la membrane protectrice

Les électrodes à oxygène de type ouvert sont facilement contaminables par des composés tel que les cyanures, le ferricyanure ou l'ascorbate. Afin d'éliminer ces réactions d'oxydo-réduction parasites de la mesure d'oxygène, la cathode de graphite a été recouverte d'une membrane de Téflon.

Les comportements de 2 électrodes à oxygène, l'une ayant sa cathode protégée par une membrane de Téflon la seconde étant non protégée, ont été comparés pour une addition de 5 mM de $\text{Fe}(\text{CN})_6$ (Cf figure 15).



ELECTRODE DE REFERENCE PROTEGEE
PAR UN PONT SALIN

Figure 14 : Amplitude de réponse de l'électrode obtenue pour différentes concentrations d'électrolytes

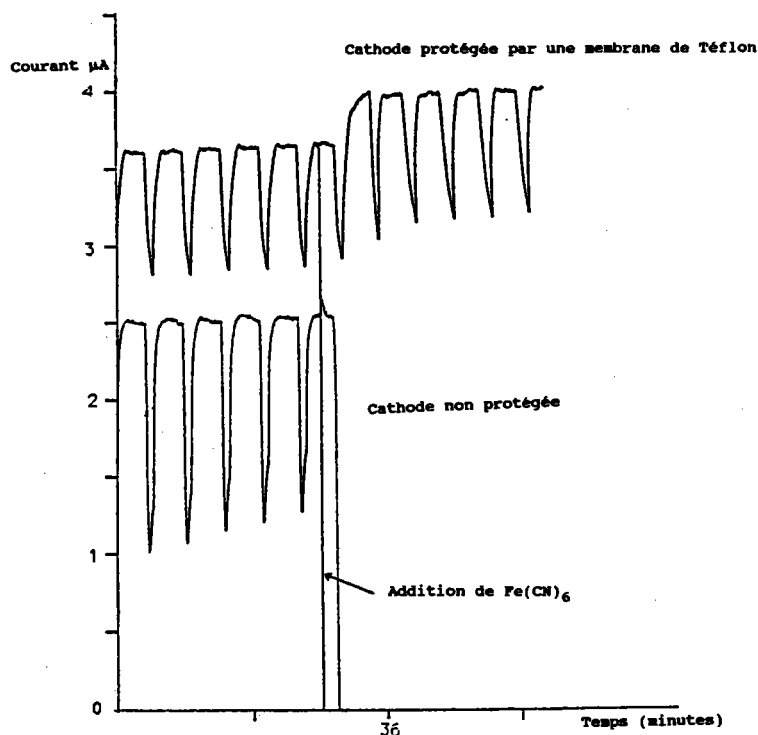


Figure 15 : Influence de la membrane protectrice lors d'une addition de $\text{Fe}(\text{CN})_6$ dans le milieu (biocatalyseur utilisé *Chlorella vulgaris*).

Les résultats obtenus ont confirmé que la membrane protégeait efficacement la cathode d'une contamination par des composés présents dans le milieu circulant.

Pour l'électrode à O_2 protégée par la membrane de Téflon, la mesure de l'oxygène photosynthétique n'est pratiquement pas affectée par cette addition de ferricyanure de potassium. En revanche, pour une cathode non protégée, le potentiel négatif favorise la réduction du ferricyanure en ferrocyanure ; cette réaction perturbe la mesure et ne permet plus de quantifier l'activité photosynthétique chez *Chlorella vulgaris*.

Des essais réalisés avec l'ascorbate de sodium ont mis également en évidence l'intérêt lié à la présence de cette membrane.

LINEK et al. (1988) définissent la membrane idéale comme faiblement perméable à l'oxygène mais avec une diffusivité élevée de l'oxygène. Cette faible perméabilité oppose une résistance élevée au transport de l'oxygène jusqu'à la cathode : ce qui favorise la réduction de la totalité de l'oxygène avec une stoechiométrie de 4 électrons. Cette membrane doit également être inerte chimiquement, résistante aux chocs et aux contraintes mécaniques, et faiblement perméable au CO_2 et à l'eau.

Compte tenu de ces critères limitatifs, ces auteurs ont dressé une liste de quelques composés utilisables pour la fabrication des membranes protectrices :

- Téflon PTFE,
- Téflon FEP,
- polyéthylène,
- polypropylène,
- mylar,
- silicone,
- cellophane.

Nous avons pu confirmer l'applicabilité des membrane de Téflons PTFE et FEP ; par contre la cellophane s'est révélée inutilisable dans le cadre de notre étude.

Cependant, l'addition d'une membrane protectrice de Téflon au niveau de la cathode a ralenti la réponse du capteur aux stimuli lumineux ; cet effet peut s'expliquer par la résistance élevée de la membrane au transport de l'oxygène (Cf figure 16).

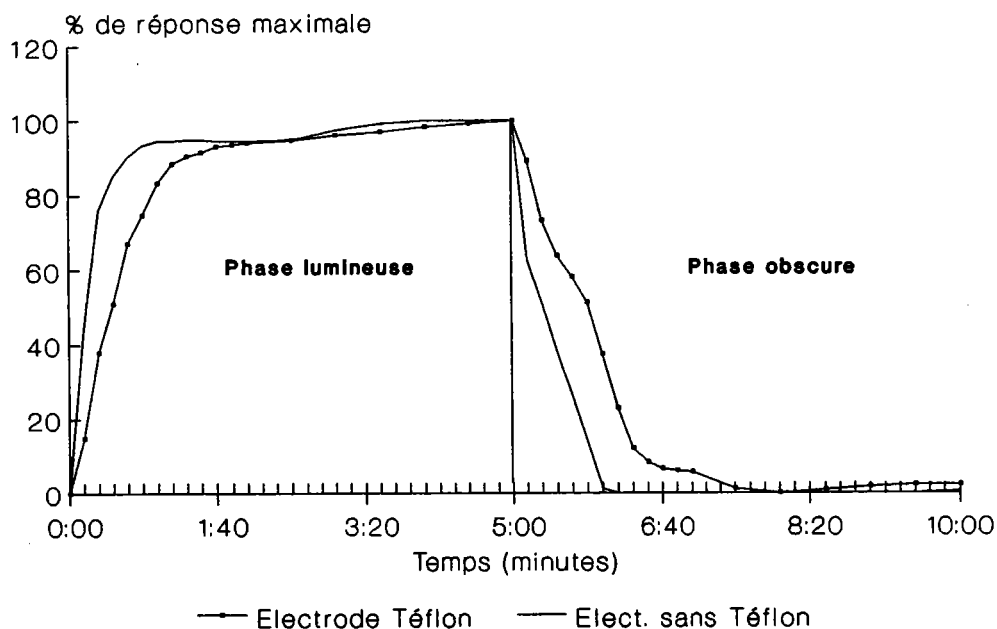


Figure 16 : Comparaison de la rapidité des réponses pour des électrodes de graphite protégées ou non par une membrane de Téflon.

5.1.2 Améliorations apportées au système

5.1.2.1 Choix du support de fixation des micro-organismes

Nous avons testé différentes membranes comme support d'adsorption des micro-organismes. Cette adsorption s'effectue par filtration (Cf chapitre 3.1.1.5). La membrane est ensuite placée et maintenue au contact étroit de l'électrode.

Les membranes retenues pour l'expérience sont de 4 types différents (tableau VII).

Tableau VII : Caractéristiques des membranes testées.

Types de membranes	Composition	Pores (µm)	Structure		Courant mesuré µA
Anotec	aluminium	0,20	rigide	translucide humidifiée	1,46
Millipore HVLP	fluorure de polyvinylidène	0,45	souple	translucide humidifiée	1,31
Pallbiodyne A Pallbiodyne B	nylon nylon	0,20 0,20	souple souple	opaque opaque	0,94 0,70
Millipore GSTF Millipore HAWP	esters de cellulose	0,22 0,45	souple souple	opaque opaque	0,41 0,71

Les membranes pallbiodyne A et B se différencient par leur charge électrique en surface :

- pallbiodyne A est une membrane amphotère dont la chimie de surface présente des groupements aminés et carboxyliques,
- la membrane pallbiodyne B offre une surface à forte densité de groupements ammonium quaternaire qui la rendent fortement cationique.

L'influence de ces membranes sur la sensibilité du biocapteur a été évaluée pour une addition de 0,100 mg/l d'isoproturon (CIBA GEIGY France) avec *Chlorella vulgaris* comme biocatalyseur (figure 17).

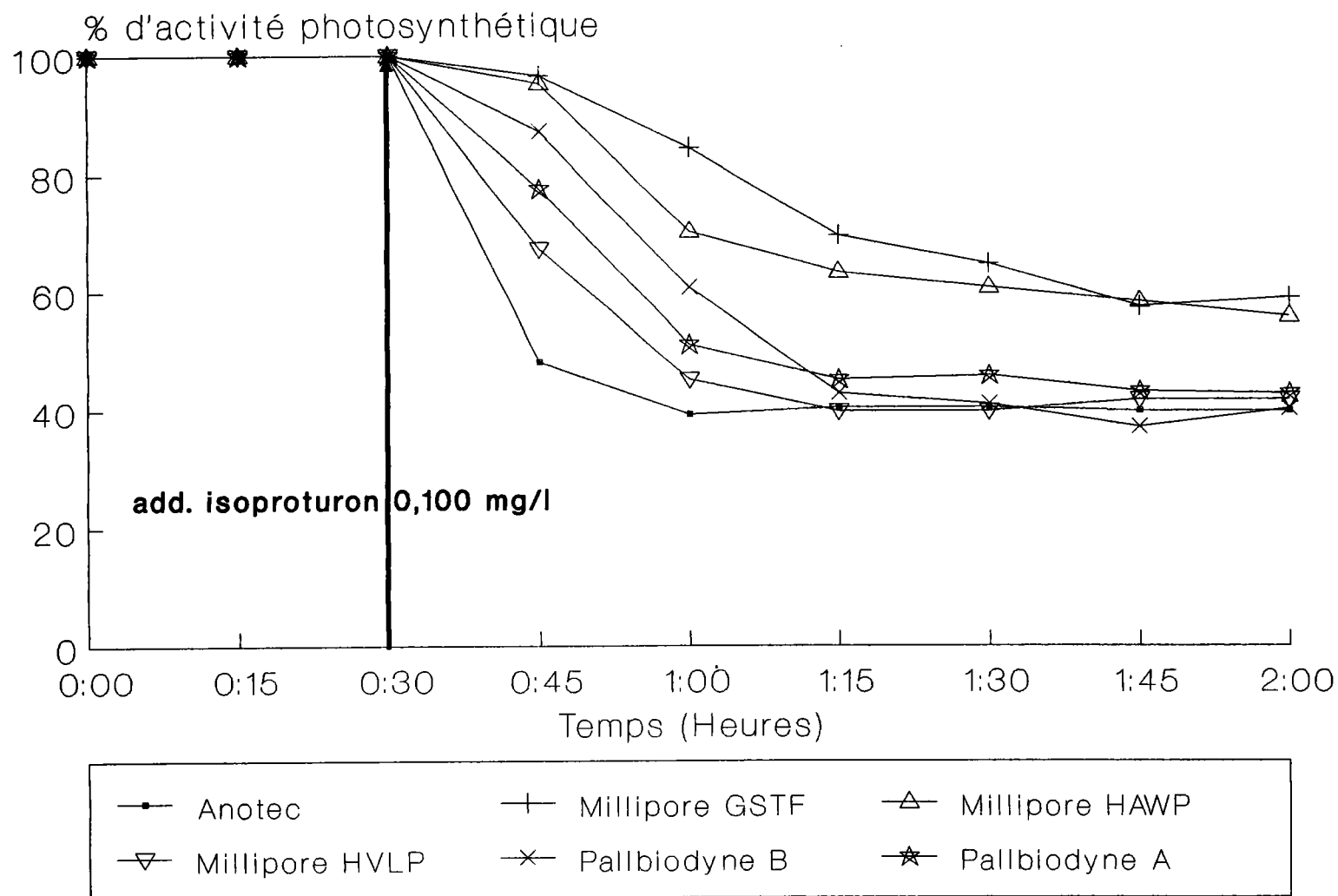


Figure 17 : Comparaison de la toxicité de l'isoproturon (0.100 mg/l) pour les différents types de membranes testés

Les électrodes préparées avec les membranes anotec, millipore HVLP, pallbiodyne B et pallbiodyne A ont présenté une sensibilité pratiquement identique. En revanche, le temps de réponse varie de manière importante : le maximum d'inhibition a été atteint après 15 minutes avec une membrane anotec, mais 30 minutes ont été nécessaires pour obtenir le maximum d'inhibition avec les membranes pallbiodyne A et millipore HVLP.

Les électrodes préparées avec des membranes d'esters de cellulose se sont révélées beaucoup moins sensibles.

Les amplitudes des courants mesurés sont plus importantes lorsque les membranes millipore HVLP ou anotec sont utilisées ; en effet ces membranes, de par leur structure, atténuent très peu l'intensité lumineuse émise par la diode (Cf tableau VII).

Nous avons retenu la membrane millipore HVLP pour nos essais, compte tenu de sa souplesse et ceci malgré le temps de réponse plus long : l'électrode se révèle ainsi moins fragile qu'une électrode à membrane d'aluminium.

Ce point aura son importance lorsqu'il s'agira de placer l'électrode *in situ*, en rivière ou à la sortie d'effluents d'origine industrielle où elle sera soumise à toutes sortes de chocs qui pourraient endommager sa structure.

5.1.2.2 Influence de l'âge de la culture sur la sensibilité des électrodes

Nous avons prélevé des fractions d'une culture de *Chlorella vulgaris* aux 3^{ème}, 4^{ème}, 5^{ème} et 6^{ème} jours de croissance et comparé la sensibilité des électrodes préparées à partir de ces fractions pour une addition d'isoproturon à la concentration de 0,100 mg/l.

La figure 18 représente la courbe de croissance de la culture utilisée avec une photopériode 16/8 (jour/nuit) : J₃ et J₄ se trouvent en phase exponentielle de croissance, J₅ et J₆ en phase de ralentissement.

Les caractéristiques des électrodes pour J₃, J₄, J₅, J₆ sont données dans le tableau VIII ci-dessous.

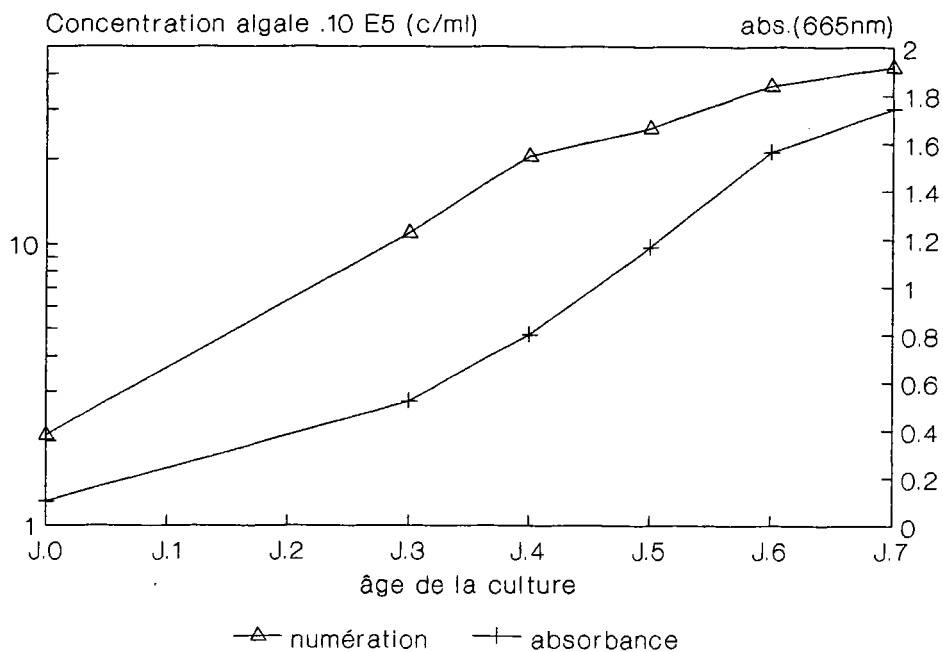


Figure 18 : Courbe de croissance de la culture de *Chlorella vulgaris* utilisée

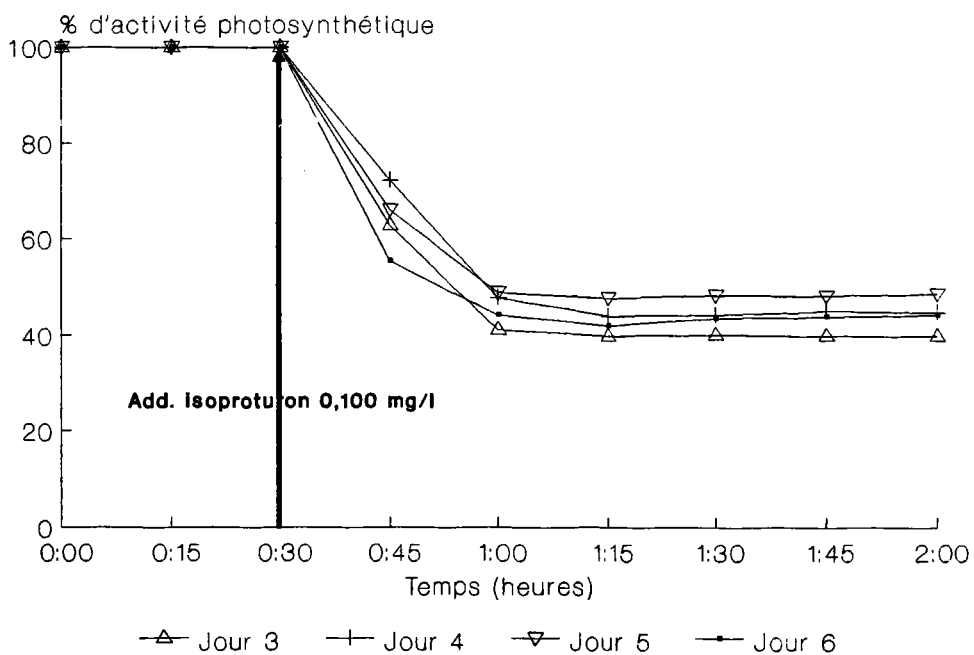


Figure 19 : Comparaison de la toxicité de l'isoproturon (0,100 mg/l) pour une même culture à différents temps de croissance

Tableau VIII : Caractéristiques des électrodes préparées avec des fractions de cultures algales prélevées à J₃, J₄, J₅, J₆

Temps de prélèv.	DO dil.	num c/ml	courant mesuré μ A
J ₃	0.517	$9.8 \cdot 10^6$	1.66 ± 0.18
J ₄	0.501	$9.1 \cdot 10^6$	1.67 ± 0.11
J ₅	0.502	$9.8 \cdot 10^6$	1.46 ± 0.11
J ₆	0.515	$1.0 \cdot 10^7$	1.85 ± 0.11

Les résultats obtenus figure 19 montrent que les électrodes préparées à J₃, J₄ ou J₅, J₆ répondent de manière similaire pour une addition d'isoproturon 0,100 mg/l. La sensibilité est donc identique que la culture utilisée, pour la préparation des membranes, soit en phase exponentielle de croissance ou en phase de ralentissement.

Pour les expériences réalisées ultérieurement les cultures algales seront prises indifféremment entre J₃ et J₅.

5.1.2.3 Influence de la concentration algale sur la sensibilité vis-à-vis des toxiques

Nous avons réalisé deux séries d'électrodes à partir d'une culture de *Scenedesmus subspicatus* : l'une préparée avec une faible quantité d'algues immobilisées, la seconde comprenant une population algale importante rapportée à la surface de la membrane active (Cf tableau IX).

Ces deux séries ont été testées avec l'isoproturon à 0,100 mg/l et Cu²⁺ à 1,5 mg/l (CuSO₄ · 5 H₂O produit Merck).

Tableau IX : Comparaison de la sensibilité des deux séries d'électrodes utilisées

Toxique testé		Qté d'algues/électrode	Rapport Mb2/Mb1	Courant mesuré μ A	Sensibilité I% T(min)
Cu^{2+} 1,5 mg/l	élect. Mb. 1	$7,35 \cdot 10^6 \text{ c/cm}^2$	13,7	$0,55 \pm 0,11$	54 420
	élect. Mb. 2	$1,01 \cdot 10^8 \text{ c/cm}^2$		$1,54 \pm 0,48$	28 420
Isopro-turon 0,1 mg/l	élect. Mb. 1	$6,03 \cdot 10^6 \text{ c/cm}^2$	14,6	$0,61 \pm 0,14$	47 30
	élect. Mb. 2	$9,23 \cdot 10^7 \text{ c/cm}^2$		$1,86 \pm 0,42$	29 30

Pour l'expérience avec l'isoproturon, les valeurs correspondent à la moyenne de 3 électrodes de chaque type ; les pourcentages d'inhibition pour le cuivre ont été calculés sur 2 valeurs.

La réponse aux ions Cu^{2+} est très lente par rapport à celle obtenue avec l'herbicide (figures 20 et 21).

L'influence de la quantité d'algues immobilisées à la surface de l'électrode est très nette. Dans le cas de l'exposition au cuivre, l'inhibition de la production d'oxygène est 2 fois plus forte pour les électrodes dont la membrane active contient peu d'algues (figure 20). Cette différence de sensibilité est encore importante après 15 heures d'expérimentation.

Pour l'isoproturon, la sensibilité plus élevée de l'électrode à faible quantité d'algues est constatée pendant les 30 premières minutes (Cf figure 21). Les pourcentages d'inhibition obtenus sont identiques après 60 minutes de temps de contact.

Ces deux expériences nous ont permis d'optimiser la concentration d'algues nécessaire pour obtenir une sensibilité maximale tout en conservant une réponse mesurable.

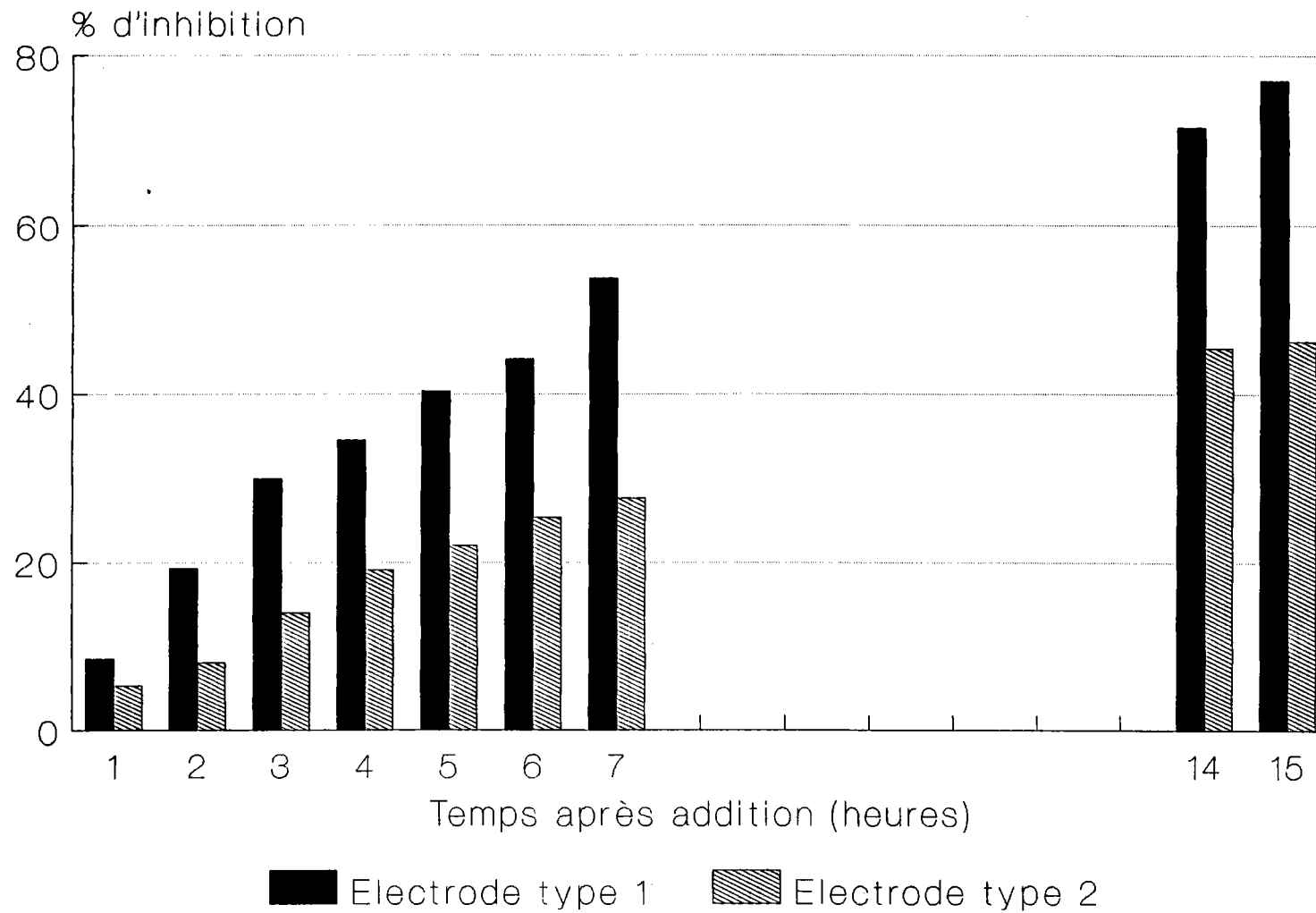


Figure 20 : Comparaison de la toxicité du cuivre (1,5 mg/l) pour 2 électrodes de concentration algale différente (Rapport de concentration Mb2/Mb1=13,7)

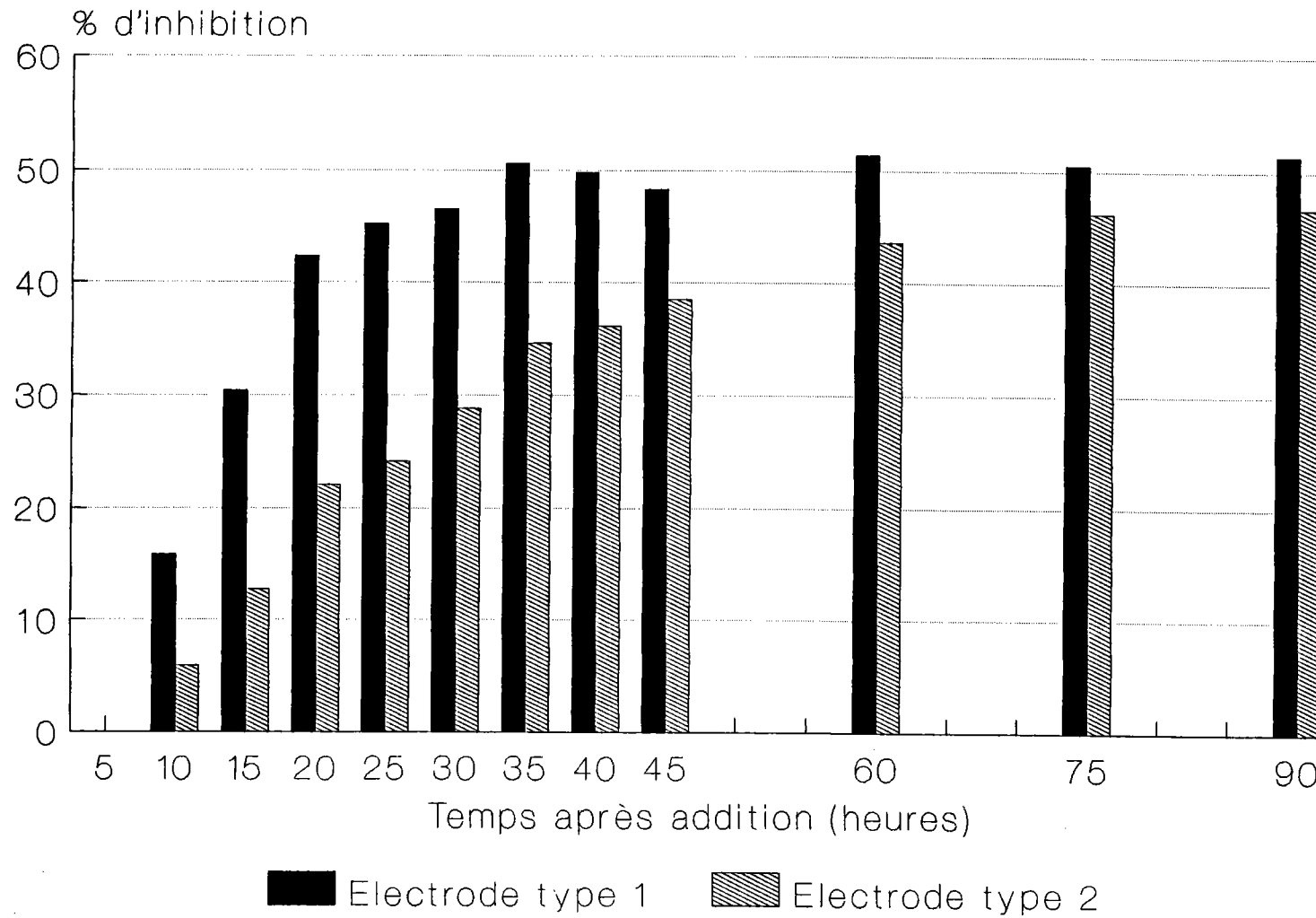


Figure 21 : Comparaison de la toxicité de l'isoproturon (0,100 mg/l) pour 2 électrodes de concentration algale différente (Rapport de concentration Mb2/Mb1=14,6)

D'autres expériences avec un ajout de cyanure de potassium ont donné des résultats similaires. En revanche, 2 séries d'électrodes dont le rapport de concentration en algues fixées est de 2,8 (soit respectivement une quantité d'algues par électrode de $1,67 \cdot 10^7$ et $4,58 \cdot 10^7$ cellules/cm²) se sont comportées de manière identique vis-à-vis de 0,100 mg/l d'isoproturon.

La sensibilité du biocapteur, comme nous venons de le mettre en évidence, est fortement influencée par la variation de la quantité d'algues filtrée par électrode. La comparaison des amplitudes de courant respectives des 2 types d'électrodes se traduit par un rapport beaucoup plus faible comparativement à celui des concentrations algales. Ainsi pour un rapport de concentration de 14,6 le rapport I₂/I₁ ne sera que de 3. La non linéarité observée entre le courant mesuré et la concentration algale pourrait résulter de la variation d'épaisseur du dépôt algal sur la membrane. Les micro-organismes sont, en effet, répartis selon des couches superposées ; et pour les plus fortes populations algales l'oxygène dégagé par les couches externes diffuse difficilement jusqu'à la cathode et n'est donc pas réduit. On atteint donc un optimum au delà duquel l'augmentation de la population algale n'influera que faiblement sur le courant mesuré.

Ces couches superposées jouent également un rôle de barrière vis-à-vis des toxiques ; leur pénétration jusqu'aux couches les plus proches de la cathode (qui dégagent l'O₂ "efficace") est ralenti pour les électrodes à fortes concentrations algales.

L'isoproturon, produit organique, pénètre plus lentement pour les électrodes à Mb 2. Ceci explique la différence de sensibilité observée pour des temps de contact courts. Lorsque ce toxique a atteint les couches internes, les pourcentages d'inhibition pour les électrodes à forte ou faible population algale sont identiques.

Le cuivre se fixe au niveau de la paroi externe des algues. La quantité de cuivre arrivant alors au contact des couches internes sera donc plus faible pour les électrodes à forte population algale : ceci pourrait expliquer l'écart constant de sensibilité observé.

5.1.3 Durée de vie du capteur

Le capteur a été testé en continu pendant une durée de 96 heures. Deux expériences ont été réalisées avec *Chlorella vulgaris* comme biocatalyseur, une troisième avec *Scenedesmus subspicatus*. L'alimentation en NaCl 0,85% est contrôlée régulièrement.

La durée de vie de ce capteur est beaucoup plus longue que celle du système à médiateur (figure 22).

Les 2 essais effectués avec *Chlorella vulgaris* présentent une différence de tracé importante. Pour les électrodes préparées avec des membranes millipore HVLP, l'intensité de la réponse décroît rapidement, principalement entre $t=0$ et $t=10$ heures. En revanche, la décroissance est régulière pour le second essai avec *Chlorella vulgaris*. Les électrodes avec ou sans membrane de Téflon se comportent de manière identique.

Cette expérience a été poursuivie jusqu'à J_7 ; les électrodes répondent toujours à un stimulus lumineux mais l'amplitude de la réponse ne représente plus que 10% de la valeur enregistrée à J_0 .

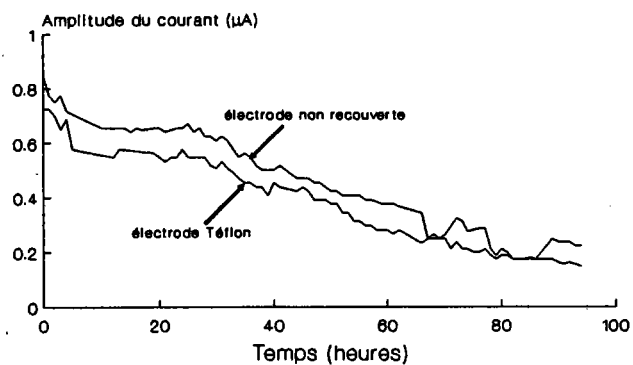
L'atténuation de la réponse observée avec *Scenedesmus subspicatus* est régulière au cours du temps.

Les tracés obtenus pour ces 3 expériences présentent un profil discontinu. Ces brusques modifications du tracé seraient dues à la présence de microbulles qui se forment dans les tuyaux d'acheminement du liquide. Celles-ci peuvent s'accumuler dans le puits où est placée la cathode, interférer sur la circulation du NaCl et donc perturber la mesure (Cf figure 7).

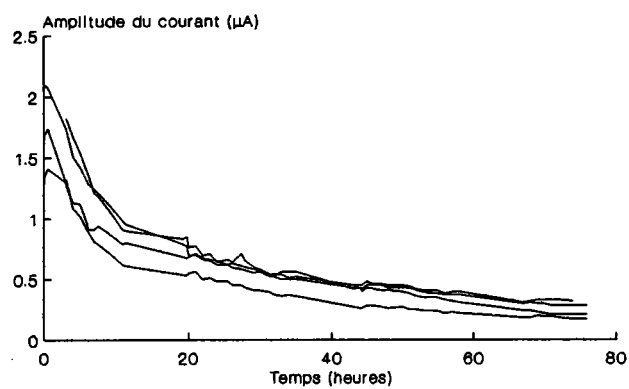
5.1.4 Conclusions sur les essais d'optimisation du système

Le prototype mis au point pour la mesure de l'oxygène photosynthétique est un système de type ouvert comprenant une cathode de graphite protégée par une membrane de Téflon et une électrode argent/chlorure d'argent (combinant anode et électrode de référence).

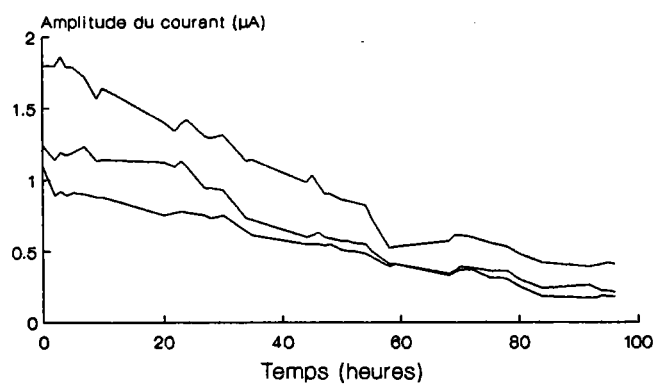
Un potentiel de -700 mV imposé entre les bornes des deux électrodes ainsi que l'addition de NaCl comme électrolyte à la concentration de 0,85% se sont révélés nécessaires pour mesurer une amplitude de courant maximale.



Chlorella vulg. / membrane Pallbiodyne B



Chlorella vulg. / memb. millipore HVLP



Scenedesmus subs. / memb. millipore HVLP

Figure 22 : Evolution de la réponse du biocapteur au cours du temps

Des variations importantes de sensibilité ont été observées selon la structure de la membrane de fixation des micro-algues. De même, la concentration de cellules algales immobilisées influe sur la sensibilité de ces bioélectrodes algales. Ainsi, des concentrations moyennes de $3,8 \cdot 10^7$; $1,3 \cdot 10^7$ et $2,6 \cdot 10^7$ cellules/cm² ont été utilisées pour la préparation des bioélectrodes avec les espèces *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus subspicatus* et *Selenastrum capricornutum*. Les valeurs retenues permettent de combiner une sensibilité élevée et amplitude de courant importante.

5.2 Sensibilité du système

5.2.1 Toxicité des substances chimiques

5.2.1.1 Toxicité des herbicides

La sensibilité de ces bioélectrodes a été testée sur une large gamme de produits herbicides (Cf tableau X).

Les résultats indiquent que ces bioélectrodes algales détectent rapidement à des concentrations peu élevées la présence de composés inhibant le transfert électronique photosynthétique ; que ces produits appartiennent au groupe des urées substituées (isoproturon, chlortoluron, métoxuron), des triazines (atrazine, simazine, prométryne, secbuméton) ou des acylanilides (propanil). La sensibilité observée pour une addition d'isoproturon (0,100 mg/l) ou d'atrazine (0,200 mg/l) est identique que l'on utilise *Chlorella vulgaris* ou *Scenedesmus subspicatus* comme biocatalyseur.

Les courbes doses/réponses pour l'isoproturon (MAY and BAKER Ltd, G.B.), l'atrazine (CIBA GEIGY Agrochemicals, G.B.) et le propanil (PROMOCHEM, G.B.) sont présentées figure 23 (le tableau des valeurs est proposé annexe IV). Ces expériences ont été effectuées avec *Chlorella vulgaris* immobilisée sur membrane anotec.

Les tracés obtenus sont similaires pour ces trois composés. Une inhibition importante de l'activité photosynthétique est observée pour de faibles concentrations en herbicides, notamment pour l'isoproturon (0,050 mg/l) et l'atrazine (0,100 mg/l). On observe une relation linéaire entre l'inhibition obtenue et la concentration en herbicides jusqu'à 0,100 mg/l pour l'isoproturon, 0,200 mg/l pour l'atrazine et 0,500 mg/l pour le propanil. Au delà de ces valeurs, la courbe d'inhibition s'infléchit : des ajouts supplémentaires d'herbicides ne modifient que dans une faible mesure le pourcentage d'inhibition mesuré.

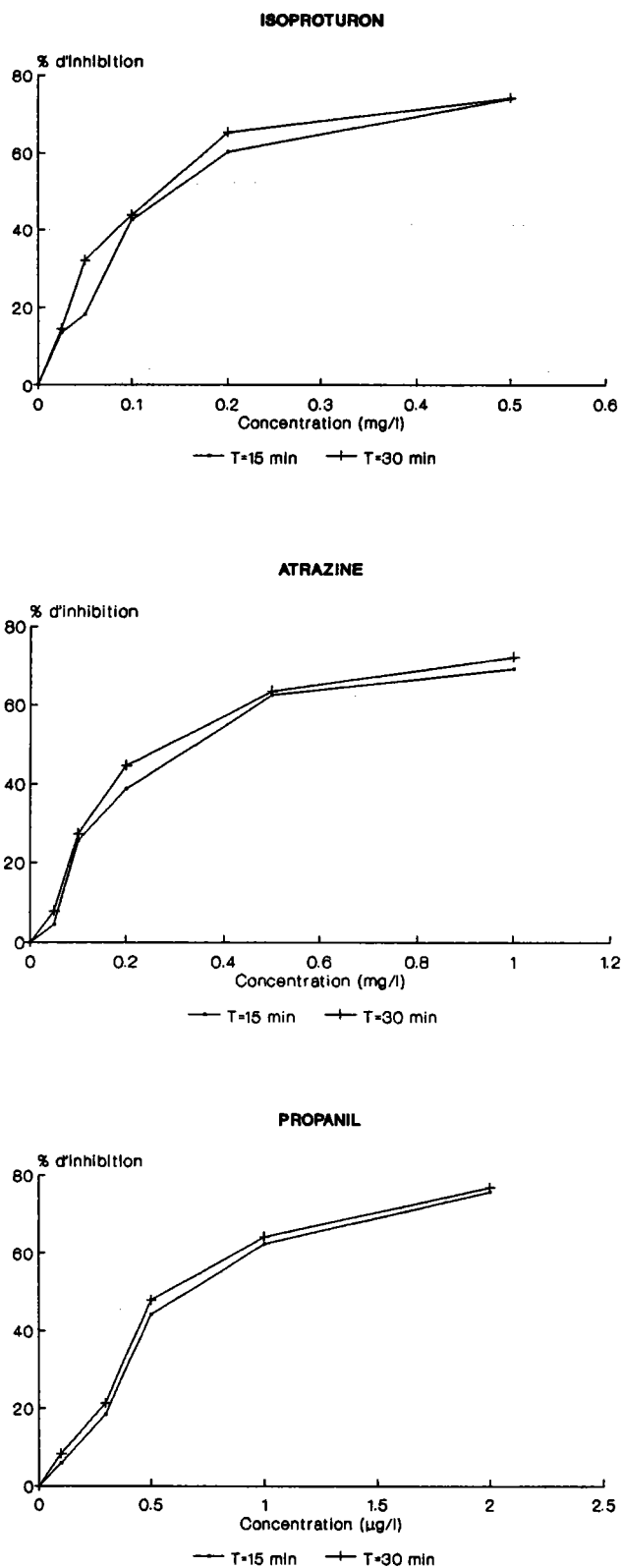


Figure 23 : Courbes d'inhibition de la production d'oxygène photosynthétique pour différents herbicides (isoproturon, atrazine et propanil)

Tableau X : Toxicité des différents herbicides : évaluation du pourcentage d'inhibition de l'activité photosynthétique après différents temps d'exposition.

Toxique testé	<i>Chlorella vulgaris</i>		<i>Scenedesmus subspicatus</i>		<i>Selenastrum capricornutum</i>	
	I%	T(min)	I%	T(min)	I%	T(min)
Isoproturon* 0,100 mg/l	34(±3) ^a 55(±2) 56(±6) ^b	15 30 30	36(±5) 51(±2) 49(±4)	15 30 30	-	
Chlortoluron* 0,100 mg/l (2)	35(±5) 60(±8)	30 60	-		-	
Métoxuron 0,100 mg/l (1)	30(±5) 33(±3)	15 30	-		-	
Atrazine* 0,200 mg/l	42(±5) 56(±4) 50(±6)	15 30 30	41(±8) 62(±8)	15 30	-	
Simazine* 0,100 mg/l (2)	21(±4) 30(±4)	30 60	-		-	
Prométryne* 0,100 mg/l	15(±1) 39(±4)	15 30	-		-	
Secbuméton* 0,100 mg/l 0,500 mg/l	25(±4) 33(±3) 67(±2)	15 30 15	-		-	
Diméthachlore* 5 mg/l	0	720	0	720	-	
Pentachlorophénol A 5 mg/l	0 0	60 300	-		10(±3) 25(±2)	60 300
Pentachlorophénol B 10 mg/l	0 0	30 120	30(±4) 56(±1)	30 120	-	
Ioxynil 2 mg/l (1)	0	480	-		-	
Bromoxynil 5 mg/l (1)	10(±1) 24(±1) 37(±1)	60 300 480	-		-	
Bromophénoxime 5 mg/ l	0	60	-		-	
Asulame 2 mg/l (1)	0	60	-		-	

Les produits suivis d'une * ont été fournis par la société CIBA-GEIGY France ; les autres composés sont de pureté analytique reconnue.

(1) : membrane anotec

(2) : membrane pallbiodyne B

(a) : variations évaluées pour les électrodes d'un même essai

(b) : variations évaluées pour différentes séries d'essais

Une des caractéristiques des herbicides qui agissent sur le transfert d'électrons du photosystème II, réside dans la réversibilité de leur action (MORELAND, 1980 ; METS et THIEL, 1989). Cette caractéristique semble indiquer que seules des liaisons faibles se forment entre l'herbicide et le site de fixation (MORELAND, 1980).

Cette réversibilité a été trouvée avec les herbicides de type urées substituées, triazines et acylanilides. En effet, après rinçage du système, l'électrode va répondre à nouveau avec une amplitude pratiquement identique à celle avant l'ajout de l'herbicide dans le milieu (Cf figure 24). Des additions successives d'isoproturon à une concentration de 0,100 mg/l (durée 1 heure) entrecoupées de rinçages par du NaCl 0,85% (durée 1 h 30) seront détectées de manière pratiquement identique (Cf figure 25).

Il est donc possible de réutiliser le capteur pour une détection de ces produits sans avoir à remplacer le biocatalyseur.

Le dimétachlore (acétanilides) appartient comme le propanil à la famille des anilides mais contrairement à ce dernier, aucune inhibition de production d'oxygène n'a été observée.

On constate une variation importante de sensibilité selon l'espèce algale choisie dans le cas du PCP : *Chlorella vulgaris* semble insensible à cette substance contrairement à *Scenedesmus subspicatus* et *Selenastrum capricornutum*. Le Pentachlorophénol testé provient de 2 sources différentes (PCP A produit GREYHOUND ; PCP B produit MERCK) ; les solutions mères ont été préparées de manière identique (dilution dans 100% de méthanol).

Le bromophénoxime peut se ranger soit parmi les dérivés benzonitriles ou les dérivés éthers ; mais par ses propriétés et son mode d'action, il se classe plutôt dans les benzonitriles (DETROUX, 1975). Les bioélectrodes algales ne sont pas sensibles à ces dérivés (ioxynil, bromophénoxime) dans les gammes de concentrations testées. Seul le bromoxynil a inhibé faiblement l'activité photosynthétique chez *Chlorella vulgaris*.

L'asulame n'agit pas directement au niveau de la photosynthèse mais inhibe la croissance et la division cellulaire en empêchant la synthèse des folates par action sur la dihydroptéroate synthétase (DUKE, 1990). Il apparaît donc logique que ce composé ne soit pas détecté par les bioélectrodes.

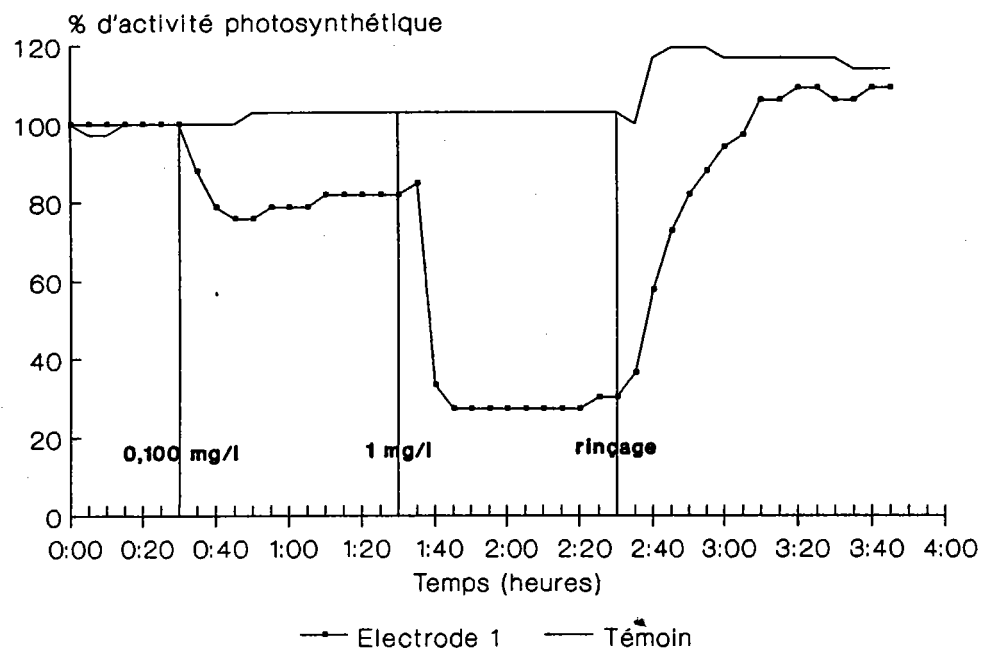


Figure 24 : Exemple de la réversibilité de l'action des herbicides sur les bioélectrodes algales

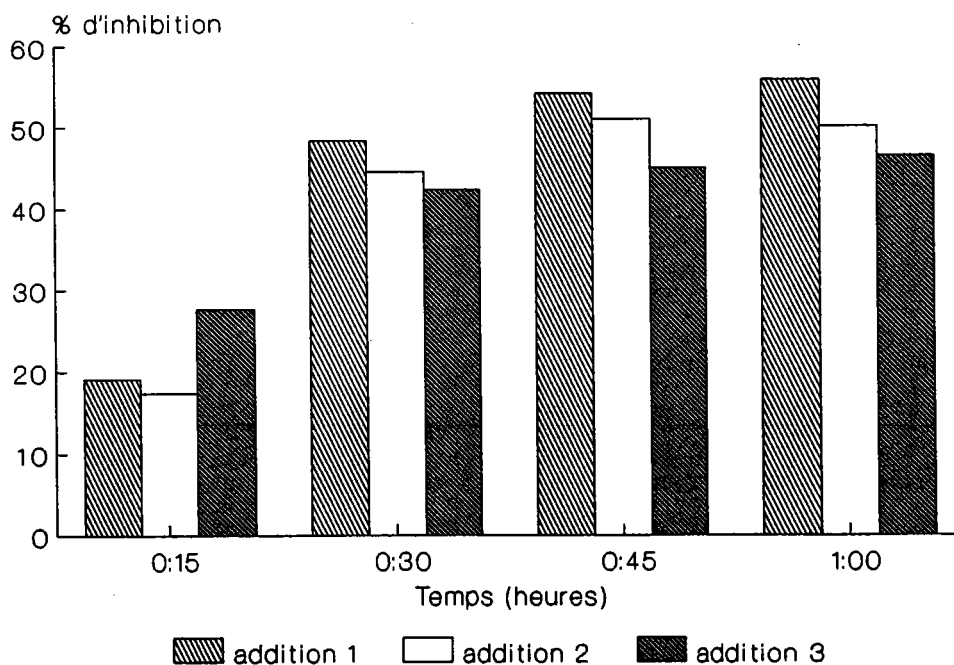


Figure 25 : Réponse d'un biocapteur utilisant *Chlorella vulgaris* pour des additions successives d'isoproturon (0,100 mg/l)

5.2.1.2 Toxicité des métaux

Seules des additions de cuivre, mercure et chrome VI (Cf tableau XI) ont entraîné une inhibition de la réponse photosynthétique des espèces algales testées. Mais l'inhibition d'activité photosynthétique observée avec ces cations métalliques s'exprime beaucoup plus lentement que pour des produits de type herbicide.

Après ajout de Cu^{2+} et Hg^{2+} dans le milieu, on constate une activation de la réponse. Celle-ci est plus ou moins marquée selon les essais. Une fois cette phase d'activation dépassée, le courant de réduction de l'oxygène mesuré décroît régulièrement. Cette diminution est très marquée pour une addition de 1,5 mg/l de Hg^{2+} (Cf figure 26).

Le biocapteur à *Chlorella vulgaris* détecte uniquement des concentrations élevées en Cu^{2+} . Une concentration de 0,500 mg/l (résultat non présenté tableau XI) est en effet indétectable ; de même, les pourcentages d'inhibition obtenus pour une addition de 1 mg/l sont faibles.

Ces expériences indiquent également une différence de sensibilité selon les espèces algales utilisées comme biocatalyseur. Ainsi, une concentration de 5 mg/l de $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ va rapidement entraîner une inhibition de la production d'oxygène chez *Chlorella vulgaris* mais l'algue *Scenedesmus subspicatus* se révèle insensible à ce produit.

OVERNELL (1975) a montré que la production d'oxygène photosynthétique pouvait être inhibée de moitié chez *Chlamydomonas reinhardtii* pour une concentration de 1,2 mg/l de Cu^{2+} et 2 mg/l en Hg^{2+} après 15 minutes de temps de contact. Le système enzymatique produisant l'oxygène photosynthétique est donc sensible aux micropolluants métalliques après un temps très court : ce qui n'apparaît pas clairement avec les bioélectrodes.

Une des hypothèses avancées concernant cette réponse peu rapide et cette faible sensibilité des bioélectrodes est une complexation de ces cations métalliques avec les ions Cl^- présents dans le milieu et avec les ions hydroxydes résultant de la création d'un micro-environnement basique à proximité de l'électrode.

Tableau XI : Toxicité des métaux : évaluation du pourcentage d'inhibition de l'activité photosynthétique après différents temps d'exposition (concentrations exprimées en mg/l de l'ion métallique)

Sel métallique testé (origine)	<i>Chlorella vulgaris</i>		<i>Scenedesmus subspicatus</i>		<i>Selenastrum capricornutum</i>	
	I%	T(min)	I%	T(min)	I%	T(min)
Pb(NO ₃) ₂ anhydre 0,2 mg/l (1) *	0	720	-		-	
Cd(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O 1,0 mg/l * 1,5 mg/l ** (2)	0	720	-		0	720
Cr(NO ₃) ₃ · 9H ₂ O 1,5 mg/l **	0	600	-		-	
K ₂ Cr ₂ O ₇ anhydre 5,0 mg/l (2) ***	24(±2)	60	-		-	
	32(±2)	120				
	36(±3)	240				
CuSO ₄ · 5H ₂ O 1,5 mg/l (3) **	20(±1)	120	-		14(±5)	120
	37(±2)	300			40(±7)	300
	70(±1)	420			46(±7)	420
	76(±3)	600			50(±9)	600
Cu(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O 1,0 mg/l	0	120	-		-	
	20(±4)	300				
	29(±5)	420				
	35(±5)	600				
1,5 mg/l (1) *	13(±1)	120	-		-	
	40(±7)	300				
	52(±6)	420				
	62(±4)	600				
Hg(NO ₃) ₂ · H ₂ O 0,2 mg/l	6(±2)	120	-		-	
	30(±1)	300				
	36(±1)	420				
	46(±2)	600				
1,5 mg/l (1) *	0	60	-		-	
	31(±7)	120				
	81(±4)	180				
	95(±1)	240				
HgCl ₂ 0,5 mg/l	-		act. 120		-	
			49(±5) 300			
			61(±4) 360			
			88(±1) 600			
1,5 mg/l (2) **	act. 60		-		-	
	13(±4) 120					
	79(±9) 180					

(1) : produit BDH

(2) : produit MERCK

(3) : produit PROLABO

act : activation de la réponse du biocapteur

* : membrane anotec

** : membrane pallbiodyne B

*** : membrane millipore HVLP

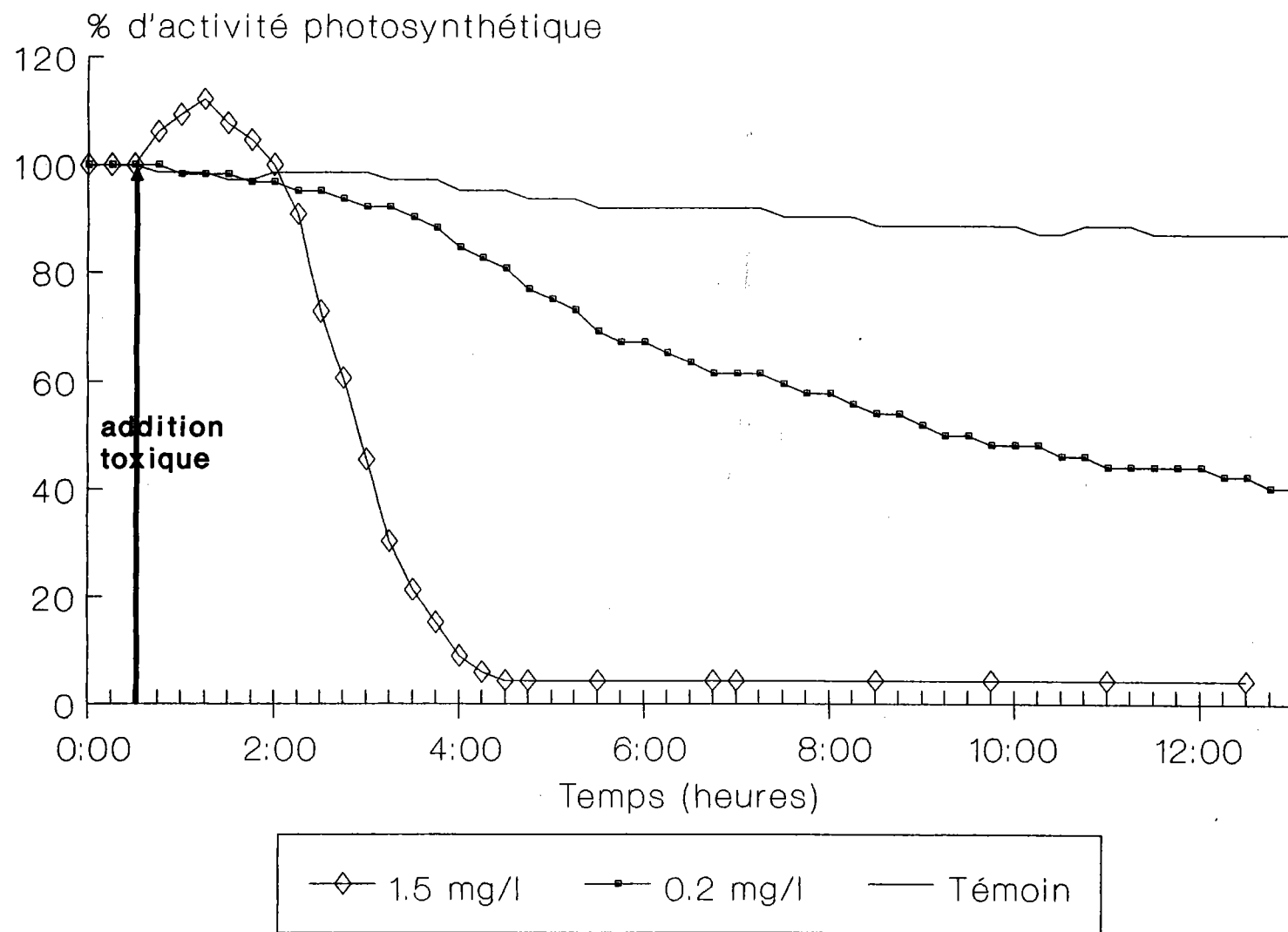


Figure 26 : Toxicité de $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ (concentrations exprimées en Hg^{2+})

Les calculs effectués pour un pH de 6,5 du milieu circulant et une concentration en Cl^- de 0,145 M indiquent que 52% des ions Cu^{2+} en solution se trouvent sous forme de complexes chlorures : principalement $\text{Cu}(\text{Cl})^+$ et $\text{Cu}(\text{Cl})_2$, 11% sous forme de $\text{Cu}(\text{OH})^+$ et 35% sont sous forme de cations libres. Une augmentation de pH même faible entraînerait la formation de complexes de type hydroxydes en proportion plus importante ; complexes qui présentent une toxicité moindre (RAI et al., 1981). Ainsi, pour une augmentation d'une unité pH (de 6,5 à 7,5) 77% du cuivre introduit en solution se trouve sous forme d'hydroxydes ($\text{Cu}(\text{OH})^+$ et $\text{Cu}(\text{OH})_2$), les complexes chlorures ne représentant plus que 14% du cuivre total. Les valeurs des constantes de complexation utilisées pour ces calculs sont présentées annexe V.

Afin de limiter la création de ce micro-environnement, la fréquence des pulsations lumineuses a été ramenée à un flash lumineux de 1 minute toutes les heures. La comparaison des pourcentages d'inhibition obtenus pour une addition de 1,5 mg/l de Cu^{2+} à cette fréquence et à la fréquence habituelle (12 flashes/heure) n'a pas montré de différences en ce qui concerne la rapidité de réponse du capteur malgré la modification des pulsations lumineuses.

Scenedesmus subspicatus a été immobilisée au contact d'une électrode de pH afin de mettre en évidence une éventuelle augmentation de l'alcalinité au niveau de l'électrode lors d'une excitation lumineuse. Une faible augmentation du pH est notée lorsque les micro-organismes sont illuminés : environ 0,2 unités pH. L'écart de pH mesuré n'est pas augmenté lorsque la population algale immobilisée est plus importante (N.B. : ces essais ont été réalisés avec une lumière blanche).

La faible variation observée ne modifie que très peu la spéciation du métal, et donc sa toxicité sur les micro-organismes. La proportion de complexes hydroxydes passe, en effet, d'une valeur de 11% à une valeur de 16%.

Des essais ont également été effectués en présence d'une substance tampon, le MOPS (acide morpholino 3 propane sulfonique) à la concentration de 0,01 M. Ce composé a été choisi parce qu'il ne forme pas de complexes avec les métaux (OVERNELL, 1975), et fixe le pH du milieu à une valeur proche de 5. Une addition de 1,5 mg/l de Cu^{2+} dans ces conditions expérimentales, entraîne une inhibition de production d'oxygène

Tableau XII : Sensibilité du biocapteur pour différents produits chimiques

Toxique testé (origine)	<i>Chlorella vulgaris</i>		<i>Scenedesmus subspicatus</i>		<i>Selenastrum capricornutum</i>	
	I%	T(min)	I%	T(min)	I%	T(min)
CN ⁻ (KCN)	0,50 mg/l	0 30	-	-	43 15 50 30	-
	1,00 mg/l	0 30	42(±3) 15 46(±4) 30	-	58(±2) 15 70(±2) 30	-
	1,33 mg/l	-	49(±1) 15 55(±3) 30	-	-	-
	3,33 mg/l (2)	0 30	-	-	-	-
S.D.S. (2)	5 mg/l	0 240	0 240	-	-	-
α-HCH (3)	5 mg/l	0 720	-	-	-	-
Lindane (1)	2,5 mg/l	0 720	0 720	-	-	-
Aldrine (4)	1 mg/l	0 180	-	-	-	-
	5 mg/l	-	0 300	-	-	-
4-nitrophénol (1)	10 mg/l	0 720	0 720	-	-	-
Triéthanol- amine (1)	10 mg/l	40(±5) 30	-	-	-	-
Triéthylamine (1)	0,1 mg/l	-	14(±4) 15 33(±4) 30 50(±6) 60	-	-	-
	1 mg/l	-	100 15	-	-	-

(1) : Produits MERCK
(2) : Produits PROLABO

(3) : Produit FLUKA
(4) : Produit OSI

De manière identique aux ions cyanures, les additions de triéthanolamine et triéthylamine modifient le pH du milieu circulant de manière importante.

La triéthanolamine à une concentration de 10 mg/l fait passer le pH d'une valeur de 6,5 à 10,5 environ. L'inhibition du courant mesuré est égale à 40% après 30 minutes de temps de contact. Si, après cette exposition, le pH est réajusté à sa valeur initiale de 6,5, on constate que l'électrode répond aux stimuli lumineux avec une amplitude pratiquement identique à celle mesurée avant intoxication.

La triéthylamine inhibe très fortement la production d'oxygène photosynthétique ; le pH augmente aussi jusqu'à une valeur de 10,9. Si, après 1 heure de temps de contact, le pH est corrigé à sa valeur initiale on ne constate pas de recouvrement de la réponse même pour une addition de 0,1 mg/l contrairement à la triéthanolamine.

La présence des insecticides aldrine et lindane n'a pu être détectée aux concentrations testées.

5.2.2 Application des bioélectrodes à des effluents industriels

Après ces essais de sensibilité sur substances pures, une série d'effluents a été choisie pour simuler l'applicabilité de ce capteur en tant que système d'alerte en milieu industriel. Les expériences ont été réalisées avec deux biocatalyseurs différents : *Scenedesmus subspicatus* et *Chlorella vulgaris*.

5.2.2.1 Réactif biologique *Scenedesmus subspicatus*

Ce biocapteur à oxygène a été appliqué à des effluents d'origine industrielle, principalement des usines de fabrication de produits chimiques : effluents A, B, C, D (tableau XIII). Ceux-ci ont subi un traitement de dépollution et sont prélevés avant rejet dans l'environnement. Nous avons complété ces expériences par 2 autres effluents, l'un provenant d'un complexe industriel retraitant les rejets riches en hydrocarbures (effluent E), le second correspondant à des résidus de cuves (effluent F).

Tableau XIII : Activité des centres industriels à l'origine des effluents

Effluent A	Fabrication de colorants organiques, de complexes de chrome III et d'acide organique dans l'isopropanol.
Effluent B	Nitration des dérivés chloroaromatiques, fractionnement, fabrication de nitranilines et de diphényléthers, synthèse de produits organiques divers.
Effluent C	Fabrication de résines échangeuses d'ions, d'additifs pour huile de moteur, de fongicides, de modifiants P.V.C., d'émulsions, de monomères de sulfate de manganèse.
Effluent D	Fabrication d'intermédiaires pour textiles synthétiques et de produits chimiques industriels (acide oxalique et cyanure de sodium).
Effluent E*	Retraitement de rejets riches en hydrocarbures et huile de coupe.
Effluent F	Produits ayant servi au traitement des bois, présence de phénols, d'hydrocarbures polycycliques et aromatiques ; 4 échantillons testés correspondant à 4 points de prélèvement.

* : Effluent prélevé avant station de traitement

Les courbes d'inhibition de l'activité photosynthétique obtenues pour ces différents effluents ainsi que leurs caractéristiques physico-chimiques sont présentées annexe VI.

Des concentrations de 2, 5, 10, 20 et 25% de l'effluent A ont été testées. Seules des teneurs de 20 et 25% ont entraîné une inhibition de la production d'oxygène chez *Scenedesmus subspicatus* (Cf figure A 1). L'addition de l'effluent augmente, en premier lieu, l'amplitude du courant mesuré. Cette excitation se poursuit durant environ 1 heure 3/4 puis le courant produit par la réduction de l'oxygène diminue très rapidement. Après 4 heures de temps de contact la réponse est réduite de 80% de sa valeur initiale pour une addition de 25% de l'effluent A.

L'effluent B s'est révélé moins toxique pour *Scenedesmus subspicatus*. Les essais réalisés avec des teneurs de 2, 5, 10, 20% dans le milieu circulant n'ont mis en évidence aucune toxicité.

La figure A 2 résume l'action de différentes concentrations de l'effluent C sur des bioélectrodes préparées avec *Scenedesmus*. L'inhibition de la réponse photosynthétique est supérieure à 50% pour une teneur de 10% d'effluent dans le milieu circulant.

Cet effluent, de par son pH élevé (Cf annexe VI), modifie le pH de la solution circulante. Celui-ci, après addition de l'échantillon, passe d'une valeur 6,5 à une valeur de 8,2. Nous avons donc réalisé l'expérience correspondant à une addition de 10% d'effluent à ces 2 pH (Cf figure A 3). Les résultats obtenus sont similaires et indiquent que la modification de pH n'influe en aucun cas sur la réponse de la bioélectrode.

Nous n'avons détecté aucune toxicité de l'effluent D même dans le cas où le biocapteur était placé dans l'effluent pur.

Des concentrations de 10 et 20% de l'effluent E ne se sont pas révélées toxiques sur notre système. Ces teneurs, au contraire, entraînent une augmentation du courant mesuré. Nous avons donc suivi l'inhibition de réponse photosynthétique pour l'effluent pur ou dilué de moitié. Du NaCl à la concentration de 0,85% a été ajouté pour assurer la conductivité électrique entre l'anode et la cathode.

La diminution du courant mesuré est alors très rapide pour les 2 essais effectués (figure A 4(a) et (b)).

L'effluent F a été prélevé en 4 sites différents. La répartition entre phases aqueuse, organiques et solide est modifiée selon les échantillons. L'effluent se décompose de la manière suivante :

- une phase organique (1) en surface,
- une phase aqueuse prédominante,
- une phase organique (2) au fond du récipient.

Pour les échantillons F 1 et F 4 la phase organique (2) est mélangée à des particules solides. Les échantillons peuvent être classés en ordre décroissant selon la proportion de phase organique :

F 1 → F 4 → F 3 → F 2.

Pour ces essais avec effluent homogénéisé, des concentrations de 2, 5, 10 et 20% ont été testées (Cf figures A 5 et A 6). Les résultats des essais indiquent que l'échantillon est d'autant plus toxique que la proportion de phase organique qu'il renferme est élevée. Il semblerait donc que cette dernière soit responsable de la toxicité du mélange. En effet, 1% de la phase organique de l'effluent F1 inhibe 60% de la réponse photosynthétique de *Scenedesmus subspicatus* après 30 minutes de temps de contact. Cette inhibition n'est que de 20% pour l'effluent total à une teneur de 10% durant le même temps.

Ces résultats concernant les effluents industriels ont été comparés à ceux obtenus avec le test Microtox, mesurant la diminution de la bioluminescence d'une bactérie marine *Photobacterium phosphoreum*.

Le tableau XIV récapitule les résultats obtenus pour ces différents effluents avec les bioélectrodes algales et le test Microtox.

D'une manière générale, le test Microtox s'est révélé plus sensible à la toxicité de ces échantillons.

L'effluent A, qui induisait en premier lieu une excitation de la réponse des algues unicellulaires, est très toxique pour *Photobacterium phosphoreum*.

L'effluent C, pour sa part, présente une toxicité élevée quelque soit le système de détection envisagé ; seul le temps nécessaire à l'expression de la toxicité est modifié.

L'effluent D ne présente aucun caractère toxique ni pour le test Microtox, ni pour les bioélectrodes algales.

Le classement des échantillons F, selon leur toxicité, est identique pour les 2 systèmes testés.

Les bioélectrodes algales, moins sensibles que le Microtox, ont néanmoins permis la détection du caractère toxique des rejets d'usines testés.

Il convient de préciser que ces effluents sont prélevés après station finale de traitement donc dans des conditions similaires à celles prévues pour l'utilisation de notre capteur. Celui-ci s'adapterait donc bien à la mise en place de systèmes d'alerte pour lutter efficacement contre les risques d'accidents liés à ce type de pollutions.

Tableau XIV : Récapitulatif des résultats obtenus avec les effluents industriels

Echantillon	Bioélectrodes algales				Microtox			
	Pourcentage effluent	Temps de contact	Pourcentage inhibition	pH analyse	C.I. 50 à 15 min - 15°C			pH analyse
					échantillon homogénéisé	échantillon décanté 4h	échantillon décanté 24h	
Effluent A	25% 25%	105 min 165 min	activation 50%	7,9	5,20%	-	-	7,7
Effluent B	20%	120 min	0%	7,5	2,80%	-	-	7,4
Effluent C	10% 10%	30 min 90 min	30% 50%	8,2	1,28%	-	-	7,4
Effluent D	100%	120 min	0%	7,3	N.T.	-	-	7,3
Effluent E	50% 100%	30 min 15 min	60% 70%	5,7 5,7	-	-	-	-
F1 Effluent F2 F3 F4	10% 10% 20%	30 min 60 min 30 min	20% 40% 80%	7,6 7,6	0,019%	-	0,420%	7,7
	20%	90 min	20%	7,8	0,230%	0,210%	0,590%	7,7
	20% 20%	30 min 90 min	30% #40%	7,9	0,135%	0,390%	0,500%	7,9
	20% 20%	30 min 60 min	20% 45%	8,0	0,048%	0,470%	0,660%	7,9

N.T. : Effluent non toxique

5.2.2.2 Réactif biologique *Chlorella vulgaris*

Dans le cadre de ces essais appliqués à des effluents industriels, des bioélectrodes, comportant comme membrane active *Chlorella vulgaris* immobilisée sur membrane pallbiodyne B, ont été testées sur des effluents d'une usine de fabrication de moteurs. Ces essais ont été réalisés sur les rejets de cette usine avant et après la station finale de traitement, ainsi que sur des huiles de coupe provenant de la chaîne de fabrication. Trois composés différents ont été testés (noms commerciaux) :

- Jidac 20Z (vert),
- HC 12 (brun foncé),
- Biopex 250B (orange).

Les huiles fournies sont des dilutions de produits purs. La seule information en notre possession concernant leur composition est la présence importante de bactéricides.

Les résultats obtenus avec les huiles de coupe sont résumés figure 27. Les composés Jidac 20Z et Biopex 250B sont totalement solubles aux concentrations testées. En revanche, la séparation phase aqueuse et phase organique est bien marquée pour le composé HC 12.

Ces 3 huiles, même aux faibles concentrations, entraînent une brusque augmentation de pH de la solution circulante, qui passe de 6 à 9. Aux plus fortes teneurs (2,5% et 5%), ces huiles modifient également la couleur du milieu circulant.

Ces 3 produits, testés à des concentrations de 5%, 2,5%, 1% et 0,5%, présentent une toxicité élevée ; une addition de 5% va, en effet, inhiber en totalité l'activité photosynthétique de *Chlorella vulgaris* après 30 ou 60 minutes de temps de contact (figure 27).

L'action de ces huiles est irréversible. Si l'électrode intoxiquée est remplacée dans un milieu propre, il n'y a pas recouvrement de l'activité photosynthétique ; phénomène qui avait été observé pour des toxiques de type herbicides (urées substituées, acylanilides et triazines).

Les bioélectrodes se révèlent donc un outil sensible pour la détection des produits de ce type.

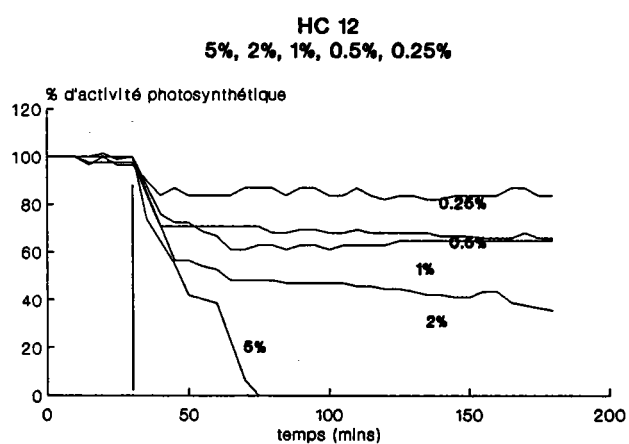
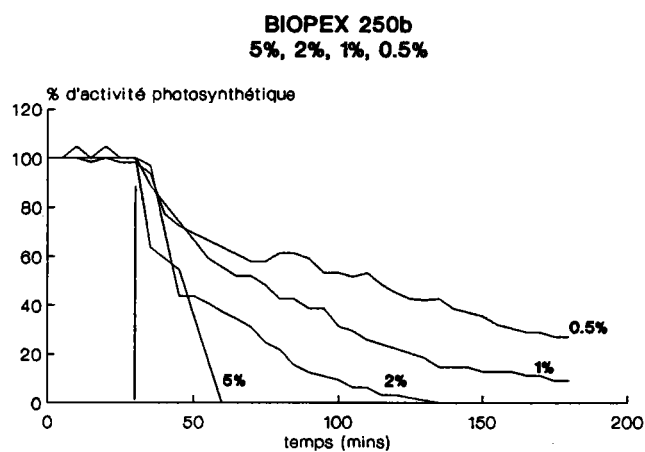
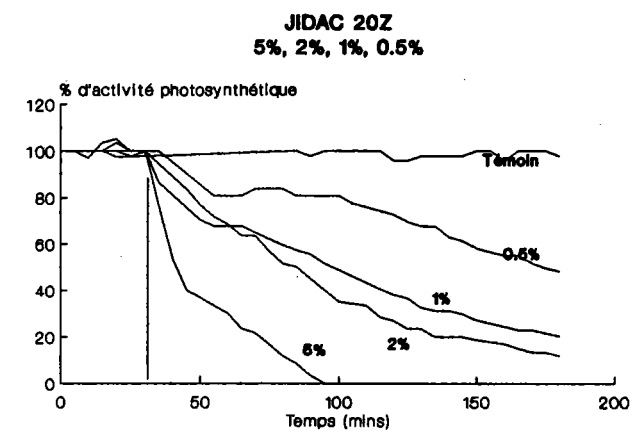


Figure 27 : Toxicité des différentes huiles de coupe testées

Les résultats relatifs aux effluents d'entrée et de sortie de station, pour 2 prélèvements A et B sont représentés figure 28 (cette station effectue uniquement un traitement physico-chimique).

Aucune toxicité n'a été observée pour les effluents entrée et sortie de station de l'échantillon A.

Pour l'entrée de station du prélèvement B, la diminution de réponse est supérieure à celle du témoin (13,5%). L'effluent de sortie, pour sa part, entraîne une diminution de réponse supérieure à 25% par rapport au témoin.

Ces résultats peuvent être corrélés avec les teneurs d'hydrocarbures des échantillons A et B (Cf tableau XV). Ce tableau reprend les concentrations d'hydrocarbures déterminées par gravimétrie après extraction à l'hexane : norme T 90-202 (AFNOR 1979a) et déterminées par spectrophotométrie après extraction au tétrachlorure de carbone : norme T 90-203 (AFNOR 1979b) ainsi que les valeurs de pH de ces effluents.

Tableau XV : Toxicité des effluents de station A et B sur les bioélectrodes algales et *Photobacterium phosphoreum* ; teneurs en hydrocarbures de ces effluents.

Echant.	Concentration hydrocarbures T 90-202	Concentration hydrocarbures T 90-203	pH	Microtox CI 50 15 min	Capteur I% après 60 min
entrée A	112 mg/l	97 mg/l	7,5	-	3%
sortie A	47 mg/l	41 mg/l	7,0	-	2%
entrée B	682 mg/l	643 mg/l	7,5	45%	13,5%
sortie B	3364 mg/l	3286 mg/l	7,1	80%	27%

Les valeurs de l'échantillon B sont beaucoup trop élevées et dépassent largement les normes de rejet tolérés. Il est étonnant de voir que l'on a un effluent plus chargé à la sortie qu'à l'entrée de la station. La concentration est multipliée par un facteur 4,5.

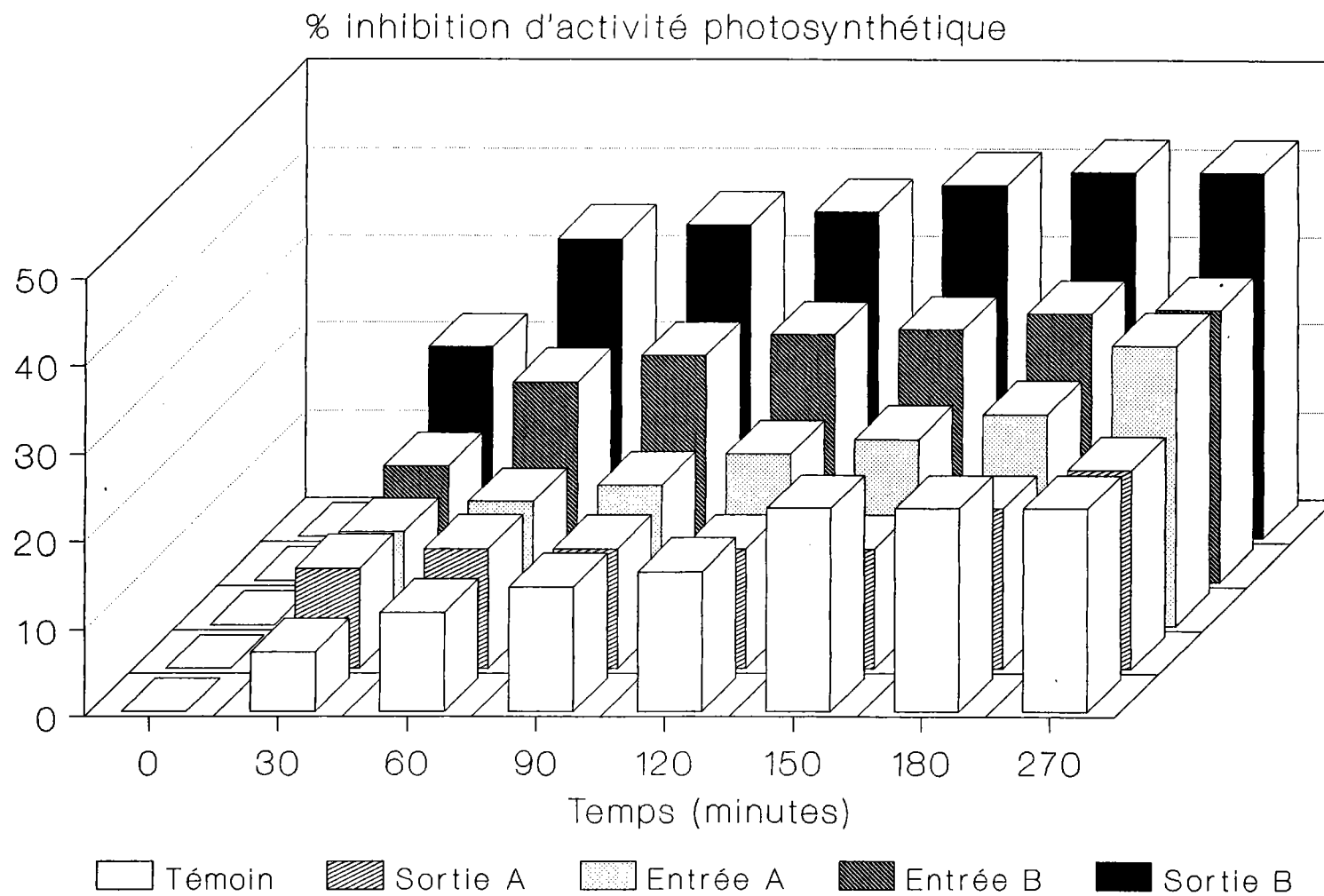


Figure 28 : Toxicité comparée des effluents en entrée et sortie de station de traitement

Nous avons réalisé des essais complémentaires sur les effluents du prélèvement B (les seuls présentant des valeurs élevées d'hydrocarbures) à l'aide du test Microtox. Des teneurs de 90% en effluent pour l'entrée et la sortie de station ont donné des valeurs d'inhibition respectivement de 45% et 80% après 15 minutes (tableau XV). Le test Microtox s'est révélé plus sensible que les bioélectrodes. Cette différence peut s'expliquer par la présence éventuelle de produits bactéricides dans les rejets. Ces produits sont couramment utilisés pour la conservation des huiles de coupe et agissent plus spécifiquement sur les espèces bactériennes.

5.3 Applications à un environnement marin

Ce biocapteur à oxygène a été développé avec des espèces algales marines comme biocatalyseur.

L'appareillage utilisé ainsi que la technique d'immobilisation du matériel biologique sont identiques. Seule la teneur en chlorure de sodium (électrolyte), ajouté dans le milieu circulant, est augmentée de façon à obtenir une concentration de 29 g/l : valeur proche de celle de l'eau de mer.

Pour les expériences réalisées avec la diatomée marine *Skeletonema costatum*, l'inhibition de réponse photosynthétique est très rapide et ne permet donc pas son utilisation en tant que biocatalyseur.

La diminution de réponse photosynthétique est moins marquée avec *Phaeodactylum tricornutum*. Mais après 8 heures d'utilisation en continu la production d'oxygène consécutive à des stimuli lumineux est nulle.

Chez ces diatomées la chlorophylle n'est pas le pigment photosynthétique majoritaire ; la longueur d'onde de la diode, plus spécifique des chlorophycées, pourrait ne pas être optimale pour exciter ces espèces algales. Une intensité lumineuse de 125 millicandellas peut également s'avérer inadaptée pour ces diatomées.

Les résultats les plus intéressants concernant la longévité du biocapteur ont été obtenus avec *Dunaliella bioculata* (chlorophycée).

Le tableau XVI reprend les valeurs d'inhibition d'activité photosynthétique pour des additions d'isoproturon, atrazine et cuivre.

Tableau XVI : Toxicité de l'isoproturon, de l'atrazine et du cuivre sur des algues marines : évaluation du pourcentage d'inhibition après différents temps d'exposition

Toxique testé (origine)	<i>Dunaliella bioculata</i>		<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	
	I%	T(min)	I%	T(min)
Isoproturon (1)	0,1 mg/l (a)	0 60	-	
	0,1 mg/l (b)	0 60	-	
	1 mg/l (a)	30(±2) 15 30(±3) 30	-	
	1 mg/l (b)	6(±1) 30	-	
	2 mg/l (a)	54(±3) 15 54(±4) 30	-	
Atrazine (2)	0,2 mg/l (a)	-	48(±2) 15 50(±3) 30	
Cu(NO ₃) ₂ · 3H ₂ O (3)	5 mg/l en Cu ²⁺	21(±5) 120 48(±10) 240 57(±10) 300	-	

(1): May and Baker Ltd

(2): Riedel de Haen

(3): BDH

(a): membrane anotec

(b): membrane d'acétate de cellulose

L'inhibition de l'activité photosynthétique chez *Dunaliella* est peu marquée pour une addition de 1 mg/l d'isoproturon. Ces résultats sont en accord avec WRIGHT (1978) qui rapporte que *Dunaliella tertiolecta* constitue l'espèce la moins sensible aux herbicides appartenant au groupe des urées substituées.

Les essais, réalisés pour 2 types de membranes différents, montrent que des électrodes préparées avec des membranes d'acétate de cellulose sont moins sensibles à l'isoproturon et confirment donc les résultats obtenus précédemment (Cf paragraphe 5.1.2.1).

Comme dans le cas des espèces algales dulcaquicoles, la détection du cuivre s'effectue très lentement.

CHAPITRE 6

CONSERVATION DES ALGUES A LONG TERME

- Lyophilisation

- Cryocongélation

- Congélation

- Conservation à 4°C

Un biocapteur doit faire preuve de rapidité, sensibilité, d'une longévité suffisante et fournir des résultats reproductibles. Dans le cadre d'une utilisation en routine *in situ*, le système mis en place doit être simple et nécessiter des interventions de maintenance les moins fréquentes possibles.

Il apparaît donc important de posséder un biocatalyseur répondant à ces attentes de sensibilité, longévité et reproductibilité et qui soit disponible sous une forme permettant un stockage ; éliminant ainsi la préparation extemporanée des électrodes algales.

Quatre types différents de conservation des micro-algues (*Chlorella vulgaris* et *Scenedesmus subspicatus*) à long terme ont été étudiés :

- la lyophilisation,
 - la crycongélation à -80°C ,
 - la congélation à -20°C ,
 - la conservation à 4°C .
- } avec et sans
cryoprotecteurs

* La lyophilisation est une technique consistant à éliminer par sublimation directe l'eau de constitution d'une solution préalablement congelée (DOUSSET, 1969).

Pour évaluer cette technique de conservation, nous avons réalisé des expériences préliminaires en préparant des électrodes (sans membrane de Téflon) à partir d'une culture de *Chlorella vulgaris*. La fraction prélevée de la culture a été centrifugée puis remise en suspension dans une solution d'agar nutritif à 2,5% (rapport poids/volume) à 5% en inositol. Ce milieu de dilution joue le rôle de cryoprotecteur. Les électrodes sont préparées comme habituellement. Deux supports différents de fixation ont été utilisés : les membranes anotec et pallbiodyne B.

Ces électrodes sont ensuite placées dans des tubes plastiques de 20 ml. Ceux-ci sont plongés dans un mélange éthylène-glycol à -40°C sans contrôle de la diminution de température puis dans le dessiccateur pendant une nuit.

Nous n'avons obtenu, pour ces électrodes, aucune réponse à une excitation lumineuse (pour les 2 membranes supports de fixation), ce qui indique une altération irréversible des cellules. Cette méthode n'apparaît donc pas appropriée pour la réalisation de notre système.

* Nous avons également porté notre attention sur la technique de cryocongélation. Comme dans le cas précédent nous avons cryocongelé des électrodes prêtes à l'emploi. Trois essais ont été effectués à partir de cultures :

- non additionnées de cryoprotecteur après centrifugation de la suspension algale (1).
- additionnées de cryoprotecteurs :
 - . glucose à 5% (poids/volume) (2),
 - . agar nutritif + inositol (3) (utilisés dans les mêmes proportions que pour la lyophilisation).

L'amplitude des réponses obtenues est faible et diminue très rapidement en fonction du temps de conservation. Ainsi les électrodes (3) (agar nutritif + inositol), après 12 heures à -80°C , donnent une réponse de $0,5\ \mu\text{A}$ stable pendant au minimum 6 heures. Après 6 jours de conservation à cette température, ces électrodes ne répondent plus à une stimulation lumineuse.

De même, des électrodes dont le culot algal est remis en suspension dans le milieu LC seul ont une amplitude de réponse de $0,25\ \mu\text{A}$ après 6 jours à -80°C . Celle-ci devient inexistante après 40 jours de conservation.

Seul l'essai 2 (glucose à 5%) a permis d'obtenir une réponse très faible à des flashes lumineux ($0,15\ \mu\text{A}$) pour des électrodes maintenues à -80°C pendant 40 jours.

Il apparaît donc qu'aucun des protocoles envisagés ne puisse être retenu comme mode de conservation.

* Des électrodes ont été congelées à une température de -20°C ; la fraction algale a été remise en suspension dans le milieu LC additionné ou non de glucose à 5%.

Ces électrodes, utilisées après 3 mois à -20°C , n'ont donné aucune réponse à une excitation lumineuse.

* Les résultats les plus probants ont été obtenus avec un biocatalyseur conservé à 4°C. Deux procédés différents ont été envisagés :

- les électrodes prêtes à l'emploi sont conservées à 4°C dans du milieu nutritif,
- les électrodes sont préparées juste avant leur utilisation à l'aide de cultures algales liquides conservées à 4°C.

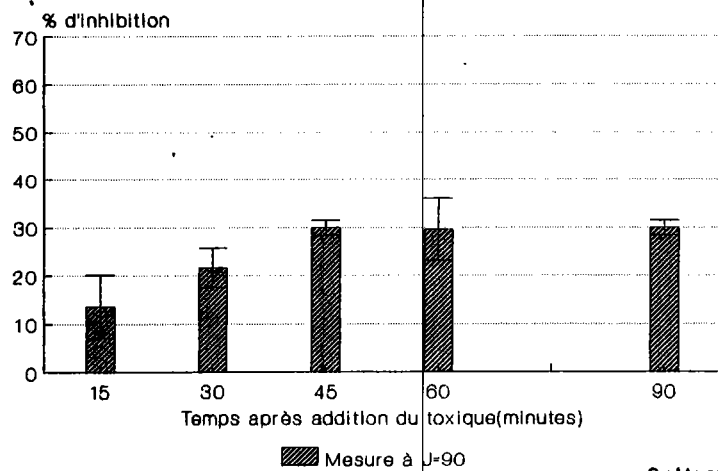
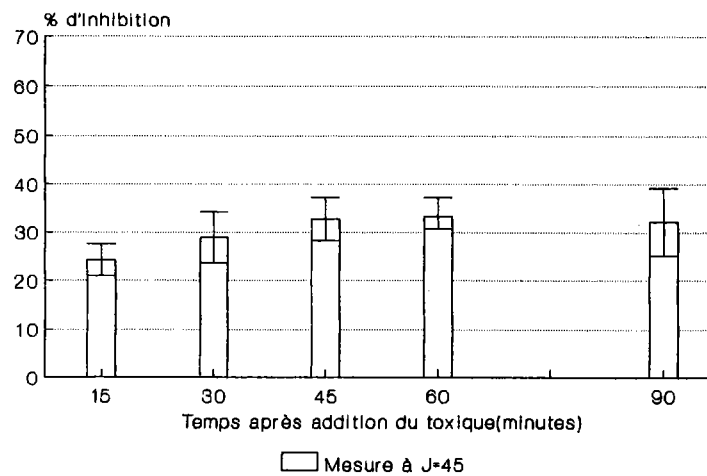
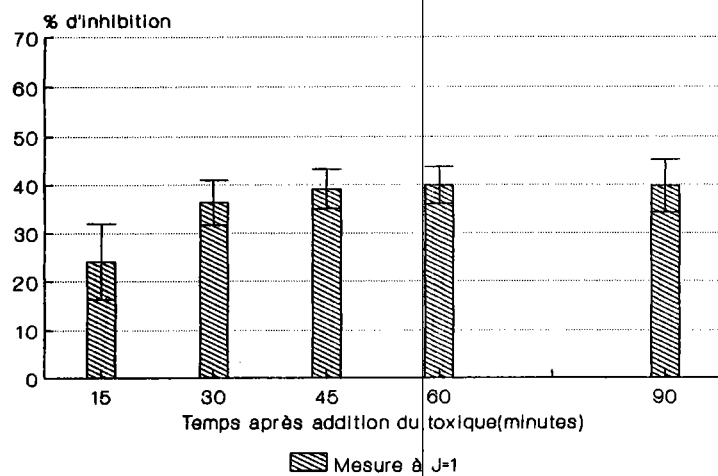
6.1 Electrodes prêtes à l'emploi

Nous avons pu tester la sensibilité des électrodes après une conservation d'une durée de 3 mois en chambre froide. L'apport de lumière est relativement faible (8 à 12 lux). Ces électrodes sont préparées en utilisant *Chlorella vulgaris* comme matériel biologique (Etant donné le nombre important d'électrodes préparées, les électrodes de graphite n'ont pas été protégées par une membrane de Téflon).

Une première série d'essais a permis de mettre en évidence une sensibilité identique de ces bioélectrodes préparées extemporanément (J_0) et électrodes après conservation 24 heures à 4°C (J_1) pour une addition d'isoproturon à la concentration de 0.100 mg/l.

La comparaison des courbes d'une seconde expérience à J_1 , J_{45} et J_{90} (figure 29) indique une faible perte de sensibilité. Une addition d'isoproturon 0.100 mg/l entraîne une inhibition de réponse de 40% ; à J_{45} et J_{90} cette inhibition n'est plus que de 30%. Les mesures effectuées à J_{90} montrent une perte de sensibilité après 15 minutes de temps de contact.

La conservation à long terme des électrodes a entraîné également une diminution de l'amplitude du courant résultant de l'excitation des micro-algues (Cf figure 30). On remarque, en revanche, que le laps de temps nécessaire à l'obtention de l'amplitude maximale de ce même courant diminue. Cette valeur passe de 50 secondes pour J_1 à 25 secondes pour J_{90} .



Culture *Chlorella vulgaris* 4]

Figure 29 : Comparaison de la toxicité de l'isoproturon (0,100 mg/l) pour des électrodes conservées à 4°C en milieu LC

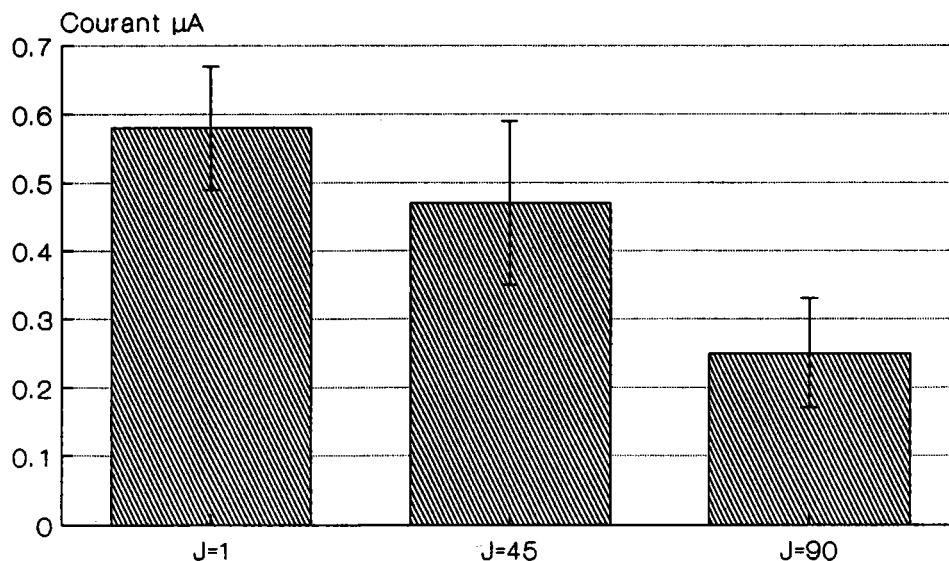


Figure 30 : Variation d'amplitude du courant mesuré pour différents temps de conservation

Remarque : Ces expériences réalisées avec des électrodes non protégées par une membrane de Téflon confirment des résultats obtenus précédemment (pour des cultures fraîches) indiquant une sensibilité à l'isoproturon plus faible dans le cas d'électrodes non protégées par rapport à des électrodes recouvertes de Téflon.

6.2 Cultures liquides

6.2.1 Etudes de sensibilité

Des fractions liquides d'une même culture de *Chlorella vulgaris* sont conservées à la chambre froide à 4°C. L'intensité lumineuse est identique à celle de l'expérience précédente.

Après un temps t fixé (0, 30, 60, 90, 120, 150, 180 jours) ces fractions sont prélevées et utilisées pour la préparation d'électrodes. Les cultures liquides sont replacées à température ambiante 1h avant cette préparation.

Les algues sont immobilisées par filtration sur membrane millipore HVLP. Comme précédemment le toxique de référence choisi est l'isoproturon à une concentration de 0,100 mg/l.

Les valeurs de densité optique, numération cellulaire et amplitude des réponses à $t=0$, 30, 60, 90, 120, 150, 180 jours sont repris dans le tableau XVII ci-dessous. Les résultats présentés correspondent à la moyenne de 4 électrodes (la même série d'électrodes de graphite a été utilisée pour tous les essais afin d'éliminer les variations de résistance des électrodes).

Tableau XVII : Caractéristiques des différentes fractions algales (densité optique, numération) et amplitudes des réponses obtenues.

	t=0	t=30j	t=60j	t=90j	t=120j	t=150j	t=180j
D.O. mesurée à 665 nm	0,423	0,380	0,370	0,360	0,375	0,355	0,352
Numération cellules/ml	$8,5 \cdot 10^6$	$8,6 \cdot 10^6$	$8,5 \cdot 10^6$	$8,5 \cdot 10^6$	$9,0 \cdot 10^6$	$9,1 \cdot 10^6$	$8,9 \cdot 10^6$
Qté d'algues/électrode	$3,6 \cdot 10^7$ /cm ²	$3,6 \cdot 10^7$ /cm ²	$3,6 \cdot 10^7$ /cm ²	$3,6 \cdot 10^7$ /cm ²	$3,8 \cdot 10^7$ /cm ²	$3,8 \cdot 10^7$ /cm ²	$3,7 \cdot 10^7$ /cm ²
Amplitude de réponse en μA	1,03 $\pm 0,17$	0,63 $\pm 0,15$	0,70 $\pm 0,15$	0,69 $\pm 0,19$	0,68 $\pm 0,23$	0,51 $\pm 0,10$	0,64 $\pm 0,16$

N.B.: l'amplitude de la réponse a été calculée juste avant addition du toxique.

La représentation graphique de l'évolution de la réponse des bioélectrodes en fonction du temps de conservation est reprise figure 31.

Les amplitudes de réponse à un stimulus lumineux sont pratiquement identiques que les algues aient été conservées 1 ou 6 mois à 4°C. Ces amplitudes sont inférieures à celles enregistrées à J_0 , de l'ordre de 30% plus faibles.

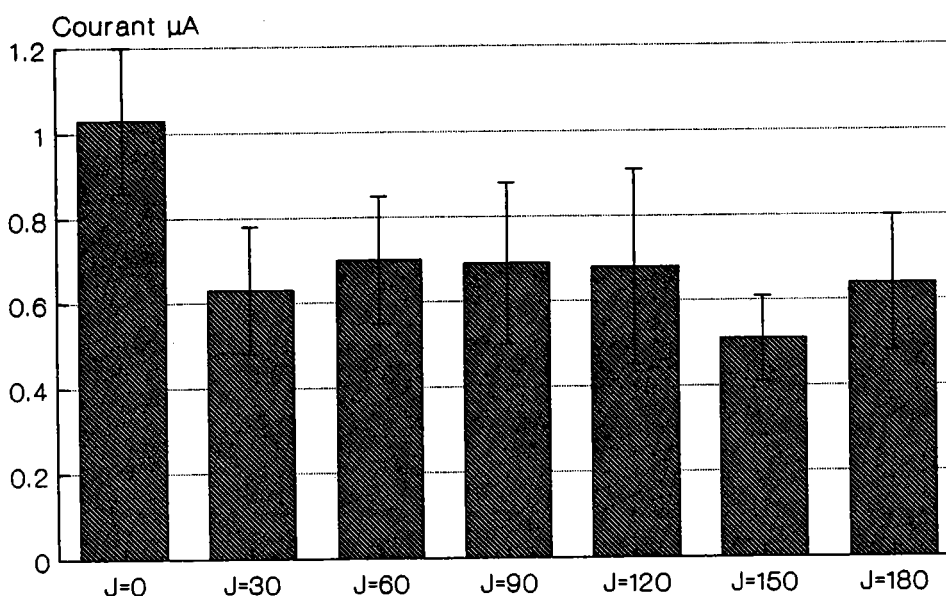


Figure 31 : Variation d'amplitude du courant mesuré pour différents temps de conservation

Cette étape de conservation entraîne, comme dans le cas précédent, une modification de la courbe de réponse des électrodes. Le laps de temps nécessaire à l'obtention de l'amplitude maximale du courant consécutif à une excitation lumineuse est diminué ; il passe de 50 secondes pour $j=0$ à 25sec/30sec lorsque les algues sont conservées à 4°C.

Le tableau XVIII reprend les pourcentages d'inhibition obtenus pour une addition de 0,100 mg/l d'isoproturon après 15, 30, 45 et 60 minutes.

Ces résultats sont représentés figure 32. Les histogrammes obtenus montrent d'une manière générale, une toxicité plus marquée de l'isoproturon sur des cellules de *Chlorella vulgaris* fraîches que sur des cellules conservées à 4°C. Les pourcentages d'inhibition obtenus pour un temps de conservation de 30, 60, 90, 120, 150, 180 jours sont très proches.

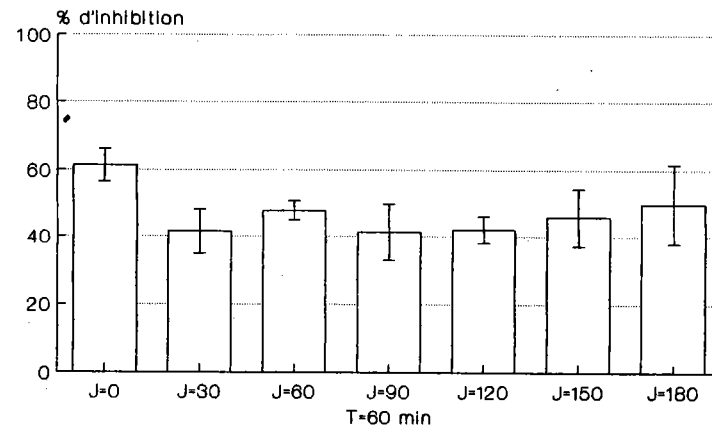
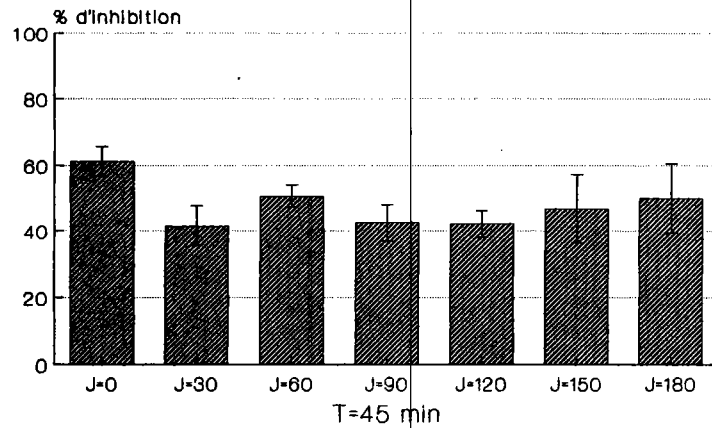
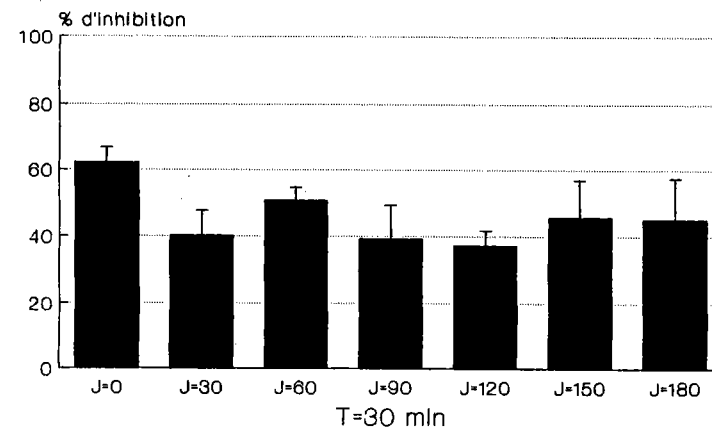
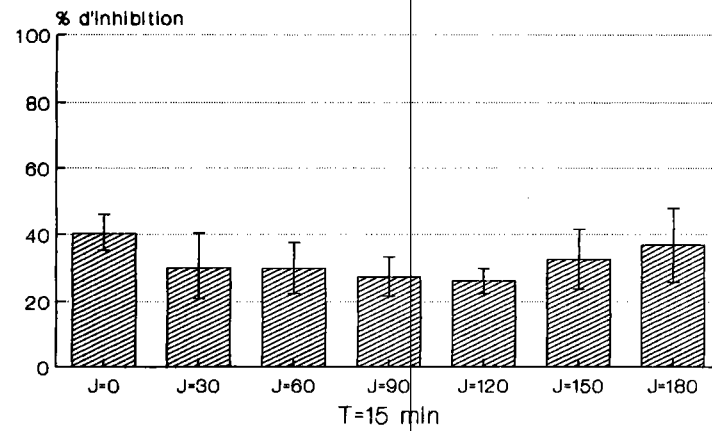


Figure 32 : Comparaison de la toxicité de l'isoproturon (0.100 mg/l) pour des électrodes préparées à partir de cultures liquides de *Chlorella vulgaris* conservées à 4°C jusqu'à 180 jours

Tableau XVIII : Pourcentages d'inhibition obtenus pour différents temps de contact avec le toxique.

	t=15 min	t=30 min	t=45 min	t=60 min
J ₀	40(±6)	62(±4)	61(±4)	61(±5)
J ₃₀	30(±9)	40(±7)	41(±6)	42(±7)
J ₆₀	30(±7)	50(±4)	51(±3)	48(±3)
J ₉₀	28(±6)	39(±10)	43(±6)	41(±8)
J ₁₂₀	26(±4)	37(±4)	42(±4)	42(±4)
J ₁₅₀	33(±9)	46(±11)	47(±10)	46(±9)
J ₁₈₀	37(±11)	45(±12)	50(±11)	50(±12)

Ces expériences de sensibilité du biocapteur à O₂ ont également porté sur la toxicité des ions cyanures (KCN) pour des cultures de *Chlorella vulgaris* et *Scenedesmus subspicatus* conservées pendant 10 mois à 4°C.

Le fait de conserver le biocatalyseur à 4°C influe sur la réponse des bioélectrodes vis-à-vis de CN⁻ (Cf tableau XIX). L'augmentation de sensibilité est très nette pour *Chlorella vulgaris* ; elle est plus faible pour *Scenedesmus subspicatus*.

Deux hypothèses peuvent être envisagées pour expliquer ces variations de sensibilité chez *Chlorella vulgaris* :

- une modification de la perméabilité membranaire permettant une accession du toxique au niveau du chloroplaste,
- une réponse accrue à la variation de pH du milieu circulant.

Tableau XIX : Toxicité comparée de CN^- pour 2 types de culture.

	<i>Chlorella vulgaris</i>		<i>Scenedesmus subspicatus</i>	
	culture A I% T(min)	culture B I% T(min)	culture A I% T(min)	culture B I% T(min)
CN^- 1,0 mg/l	0 60	-	42(±3) 15 46(±4) 30	62(±3) 15 67(±5) 30
CN^- 3,3 mg/l	0 60	71(±6) 15 75(±5) 30	-	-

culture A : culture fraîche

culture B : culture conservée 10 mois à 4°C

L'addition de KCN dans le milieu circulant augmente le pH de 6,5 à 9,5 (Cf paragraphe 5.2.1.3). Des essais de modification du pH de la solution circulante de 6,5 à 9,5 par de la soude 1N, en dehors de toute exposition toxique, ont mis en évidence une forte variation d'amplitude de réponse pour les cultures conservées à 4°C ; phénomène qui n'avait pas été observé dans le cas de cultures fraîches. La diminution enregistrée est de 40(±4)% après 15 minutes et 53(±3)% après 30 minutes. Il semble donc que l'inhibition d'activité photosynthétique soit imputable essentiellement à cette modification de pH.

6.2.2 Stabilité de la réponse

Une fraction de culture liquide de *Chlorella vulgaris* conservée 6 mois à 4°C est utilisée pour la préparation d'une série d'électrodes. La réponse de ces électrodes à des stimuli lumineux est suivie et enregistrée en continu pendant 72 heures. Le tracé des courbes obtenues est représenté figure 33 (pour une série de 4 électrodes).

L'amplitude du courant diminue très rapidement durant les deux premières heures d'utilisation (diminution surtout marquée pour les deux ou trois premières pulsations). Le courant mesuré se stabilise par la suite.

La comparaison de ces courbes avec celles obtenues pour une culture fraîche (figure 34) montre que, pour cette dernière, la décroissance s'effectue plus lentement. Elle est assez marquée entre 0 et 10 heures d'utilisation. Cette diminution n'empêche en aucun cas la détection d'une pointe de pollution pendant ce laps de temps.

6.2.3 Etudes microscopiques

Des études microscopiques (microscopie optique et microscopie électronique à balayage) ont été réalisées sur ces cultures conservées à 4°C.

Les observations en microscopie optique (Gx1000) ont mis en évidence une réduction importante de la taille du chloroplaste chez *Scenedesmus subspicatus* et *Chlorella vulgaris* pour les cultures conservées pendant 6 mois à 4°C par rapport à des cellules algales fraîchement prélevées.

L'algue *Chlorella vulgaris* présente une structure identique en microscopie électronique à balayage pour les cultures conservées à 4°C et les cultures témoins. En revanche, les clichés obtenus pour *Scenedesmus subspicatus* montrent une modification importante de structure entre les deux types de cultures. Après conservation les cellules algales sont totalement applaties ne possédant plus de formes définies.

Malgré ces altérations de la structure de *Scenedesmus subspicatus*, le système enzymatique produisant l'oxygène photosynthétique est toujours actif et la réponse à des stimuli lumineux est stable dans le temps (Cf paragraphe 6.2.2).

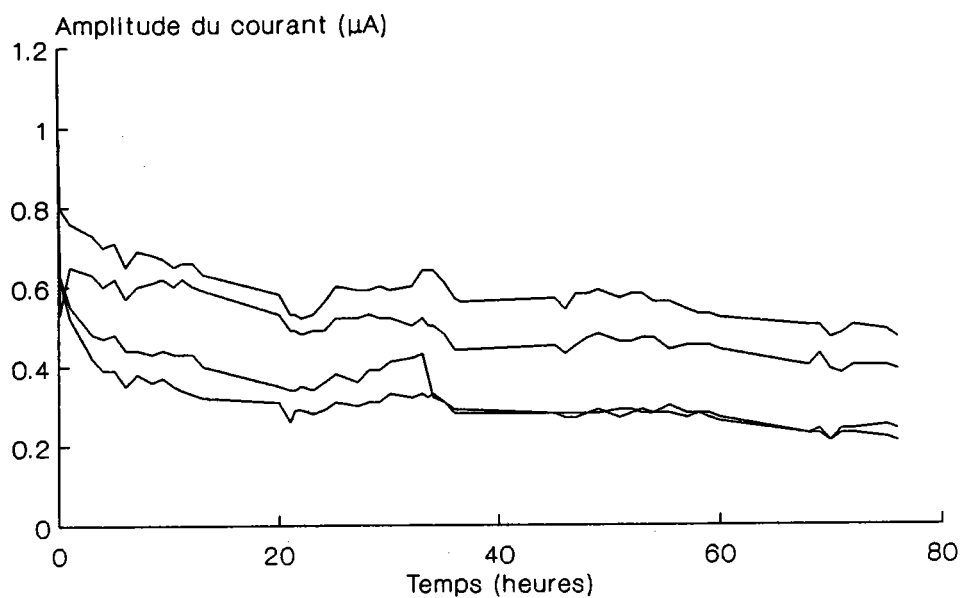


Figure 33 : Evolution de la réponse du biocapteur au cours du temps
(culture conservée 6 mois à 4°C)

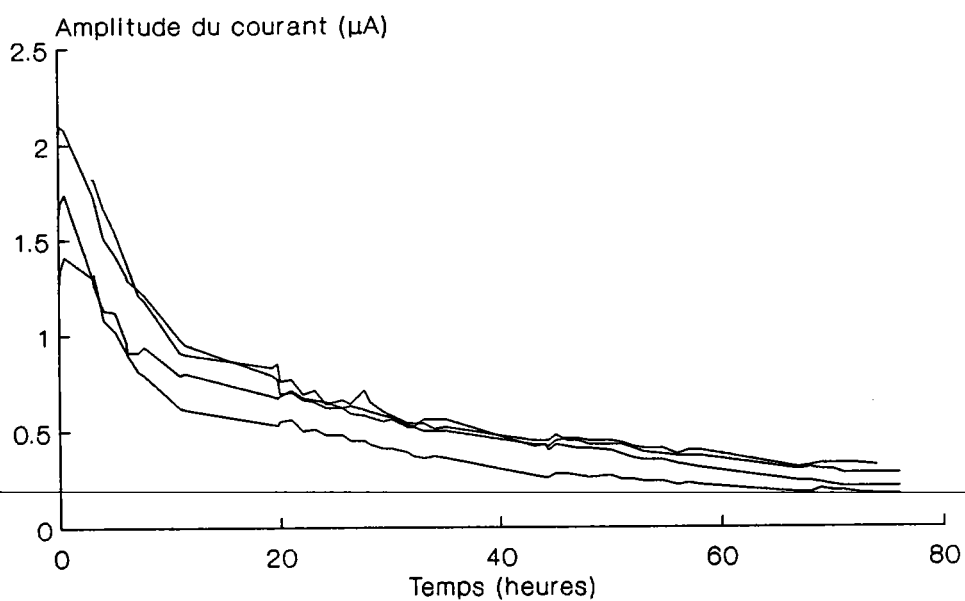


Figure 34 : Evolution de la réponse du biocapteur au cours du temps
(culture fraîche)

CHAPITRE 7

DISCUSSION

7.1 Spectre d'applicabilité des bioélectrodes algales

La photosynthèse est un processus fondamental et spécifique des espèces végétales ; ces deux caractères justifient que l'activité du système photosynthétique soit utilisée comme critère de toxicité des micropolluants hydriques sur ces espèces.

Parmi les indicateurs possibles d'une activité photosynthétique, nous avons choisi d'étudier deux réactions caractéristiques :

- le flux d'électrons émis par les photosystèmes I et II, transférés par les systèmes rédox des thylacoïdes du chloroplaste jusqu'au NADP^+ ,
- la quantité d'oxygène produit par photolyse de l'eau lors de stimuli lumineux.

La spécificité de ces indicateurs et leur validité en tant que marqueurs de la photosynthèse étaient assurées dans ce travail par le fait que l'on pouvait s'affranchir de l'influence d'autres réactions métaboliques cellulaires, capables de mettre en jeu également des transferts d'électrons et l'oxygène : la respiration mitochondriale en particulier.

Un flux d'électrons mesuré à partir de préparation de cellules entières et non de chloroplastes isolés intègrerait effectivement le flux électronique produit et par la photosynthèse et par la respiration ; le taux d'oxygène étant la résultante de la quantité d' O_2 produit par la photosynthèse et de celle consommée par la respiration.

Si la respiration cellulaire a lieu aussi bien à l'obscurité qu'à la lumière, l'émission d'électrons ou la production d'oxygène chloroplastique n'a lieu, par contre, qu'en phase lumineuse. De sorte que la mesure de ces deux processus, en réponse à des stimuli lumineux, permet d'évaluer spécifiquement l'intensité de l'activité photosynthétique ; la part revenant à l'activité respiratoire étant une composante du courant de base des enregistrements obtenus.

La spécificité des mesures effectuées par les deux biocapteurs à algues immobilisées explique que seront détectés uniquement les effets sur le système photosynthétique : les substances agissant sur un autre système métabolique comme le cadmium, l'aldrine, le lindane ou l'asulame n'ont pas d'action sur les bioélectrodes et ne sont pas identifiés comme toxiques.

Ce caractère est à la fois un avantage et un inconvénient des deux systèmes développés :

- avantage lorsqu'il s'agira de détecter des substances toxiques spécifiques des organismes végétaux : caractéristique recherchée pour les herbicides,
- inconvénient car le domaine d'application des bioélectrodes sera restreint à ces substances.

Les bioélectrodes algales ne se substituent donc pas, mais complètent la batterie d'essais mise en oeuvre pour la détection des micropolluants hydriques. Comme les essais classiques sur micro-algues, elles constituent un outil complémentaire aux tests daphnies, Microtox et poissons pour le screening spécifique des substances toxiques pour les espèces végétales. Les bioélectrodes ajoutent encore aux tests algues classiques, le fait de donner une réponse en temps réel et d'être applicables en dynamique, *in situ* aussi bien dans le milieu dulçaquicole que le milieu marin.

7.2 Comparaison et intérêt des systèmes développés

Pour pouvoir être opérationnels, les deux capteurs développés nécessitent l'addition de composés dans le milieu à analyser : médiateur pour la mesure du flux électronique, électrolyte pour le biocapteur à oxygène.

Pour le premier système, l'impossibilité de réaliser un transfert direct d'électrons, entre le biocatalyseur et l'électrode nous a conduit à utiliser une molécule électro-active (médiateur) qui détourne les électrons émis des chloroplastes jusqu'à l'électrode. Le médiateur agit ainsi au niveau de la chaîne de transfert électronique comme un accepteur terminal d'électrons. La *p*-benzoquinone à la concentration de 0,2 mM s'est révélée être le médiateur le plus efficace ; sa toxicité pour les cellules algales limite cependant la durée de vie du capteur (Cf tableau XXI). L'activité photosynthétique de *Chlorella vulgaris* ne correspond plus qu'à 20% de l'activité maximale après 16 heures d'utilisation en continu ; elle est nulle après 24 heures.

Le système à médiateur présente d'autres inconvénients que ceux liés à sa faible durée de vie :

- une faible périodicité des mesures enregistrées,
- la présence du médiateur en solution,
- la réactivité du médiateur à la lumière.

La périodicité des mesures pour le système à médiateur est de 30 minutes environ, avec des durées identiques pour la phase lumineuse et la phase obscure. Ces périodes de temps relativement longues sont nécessaires pour obtenir un courant photosynthétique d'amplitude constante et pour revenir à la valeur du courant de base avant illumination (Cf figure 8).

Ces intervalles de temps élevés limitent de ce fait le nombre d'informations sur l'activité photosynthétique des algues immobilisées. Le système de mesure va enregistrer une information toutes les 30 minutes. Ce laps de temps important peut être un handicap dans le cas d'une utilisation *in situ* en augmentant le temps de réponse du capteur.

L'application de ce système à médiateur pour le contrôle de la toxicité des eaux n'apparaît donc pas réalisable avec des algues eucaryotes même s'il présente une sensibilité élevée pour certains herbicides en début

de fonctionnement. La durée potentielle d'utilisation est, en effet, trop faible pour que ce système d'alerte puisse être utilisé en routine.

L'addition d'une molécule électro-active dans le milieu à analyser peut entraîner également des réactions d'oxydo réduction parasites avec certains composés présents dans ce milieu et ainsi perturber la mesure effectuée.

Tableau XXI : Comparaison des conditions d'utilisation des deux biocapteurs développés

	Système à médiateur	Biocapteur à oxygène
Stimulation de l'activité photosynthétique	diode émettrice rouge (maximum 635 nm)	
Détection activité mesurée	électrons photosynthétiques	dégagement d'oxygène
Cellule électrochimique	électrode de graphite + médiateur	électrode à oxygène semi-protégée
Addition de composés dans le milieu circulant	médiateur : <i>p</i> -benzoquinone 0,2mM	électrolyte : NaCl 0,145 M (0,85%)
Pot. imposé entre les 2 électrodes	+ 550 mV	- 700 mV
Signal mesuré	courant de réoxydation du médiateur	courant de réduction de l'oxygène
Biocatalyseur utilisé	algues unicellulaires	
Immobilisation du biocatalyseur	filtration sur membrane double membrane membrane simple	
Périodicité des flashes lumineux	20 à 30 minutes	5 minutes
- phase lumineuse	10 à 15 minutes	1 minute
- phase obscure	10 à 15 minutes	4 minutes
Durée de vie du capteur	< 24 heures	≈ 7 jours

Le biocapteur à oxygène, pour sa part, s'est révélé beaucoup plus intéressant ayant fait preuve de sensibilité, reproductibilité et d'une longévité satisfaisante. La configuration de l'électrode à oxygène de type ouvert rend certes indispensable l'addition d'un électrolyte (NaCl 0,145 M) dans le milieu circulant pour permettre les réactions d'oxydo-réduction ; mais cette addition de NaCl ne présente pas de caractère toxique. La période d'utilisation de ces bioélectrodes peut donc être étendue jusqu'à 7 jours.

La périodicité des mesures est beaucoup plus courte ; l'intervalle entre deux mesures n'est que de 5 minutes, dont une minute pour la phase lumineuse et 4 minutes d'obscurité.

Le screening de molécules toxiques, entrepris avec les deux capteurs développés, a montré que ceux-ci faisaient effectivement preuve d'une sensibilité très élevée aux substances qui bloquent le transfert d'électrons du photosystème II entre Q_A et Q_B en se fixant au niveau de sous unité protéique D1 : urées substituées, triazines et acylanilides, utilisées pour cette raison comme herbicides. Les limites de détection pour ces produits avec le système à médiateur sont comprises entre 0,010 et 0,050 mg/l. Les performances du biocapteur à oxygène sont un peu plus faibles pour des acylanilides avec une limite de détection de l'ordre de 0,100 mg/l.

Des métaux comme le mercure et le cuivre, reconnus pour avoir un site d'action au niveau photosynthétique, n'ont pas été détectés avec le système à médiateur. Ces métaux ont présenté, en revanche, une toxicité pour le biocapteur à oxygène, mais l'inhibition de l'activité photosynthétique s'est exprimée plus lentement que pour des produits de type herbicides (quelques heures par rapport à quelques minutes) et pour des concentrations élevées de toxiques.

La sensibilité du biocapteur à oxygène a été comparée à celle de tests classiques d'inhibition de croissance des micro-algues et à des méthodes de détections rapides de la toxicité (tableau XXII).

A cet effet, nous avons effectué des essais pour évaluer la toxicité de l'isoproturon et des cyanures sur la croissance des micro-algues utilisées avec les bioélectrodes. Pour les autres substances, nous nous

Tableau XXII : Comparaison de la sensibilité du biocapteur (électrode à O₂) à celle d'autres méthodes utilisées en écotoxicologie.

Toxique	espèces	ELECTRODE A OXYGENE			TESTS D'INHIBITION DE CROISSANCE		PRODUCTION D'OXYGENE		MICROTOX	
		CI 50 (mg/l)			CI 50 (mg/l)		CI 50 (mg/l)		CI 50 (mg/l)	
		30 min	2.5 h	6 h	72 h		15 min		15 min	
ISOPROTURON	<i>Chlorella</i>	0,1			0,15					
PROPANIL	<i>Chlorella</i>	0,5			0,09	(1)	Feuilles d'épinard	1,7	(4)	
ATRAZINE	<i>Selenastrum</i>	0,2			0,10	(2)	Feuilles d'épinard	0,32	(4)	90 (6)
Cu ²⁺	<i>Selenastrum</i>			1,5	(0,010-0,28) (3)		<i>Chlamydomonas</i>	1,2	(5)	0,12* (6)
Hg ²⁺	<i>Chlorella</i>		1,5		(0,010-1) (1)		<i>Chlamydomonas</i>	2,0	(5)	0,05 (7)
CN ⁻	<i>Selenastrum</i>	1,0			0,40					4,0 (7)
	<i>Chlorella</i>	>3,3			0,40					
	<i>Scenedesmus</i>	1,3			0,40					

* : CI 50 calculée après 5 minutes d'exposition

(1) STRATTON 1987

(2) ROBERT et al. 1990

(3) VASSEUR et al. 1988

(4) HYEON et al. 1982

(5) OVERNELL 1975

(6) RETEUNA et al. 1989

(7) BECKMAN 1981

sommes référés aux données bibliographiques relatives aux concentrations inhibant 50 % de la croissance algale dans des conditions standardisées.

Une comparaison a été faite également avec les travaux de HYEON et al. (1982) et OVERNELL (1975) qui ont évalué la toxicité de substances métalliques sur la production d'oxygène photosynthétique d'espèces végétales.

Il était intéressant, enfin, de situer la sensibilité de la réponse de cette bioélectrode algale par rapport à celle de méthodes de détection rapide de la toxicité comme le test Microtox qui mesure l'inhibition de la bioluminescence de *Photobacterium phosphoreum*.

Les C.I. 50 obtenues avec les bioélectrodes, pour des herbicides appartenant aux groupes des urées substituées et des triazines (respectivement isoproturon et atrazine) sont très proches de celles déterminées par un test d'inhibition de croissance algale. La détection de ces herbicides est rapide : l'inhibition maximale de réponse étant obtenue après 15 minutes de contact ce qui représente un gain de temps appréciable par rapport aux tests algues classiques.

Les bioélectrodes sont plus sensibles à l'atrazine que l'essai d'inhibition de la production d'O₂ par une feuille d'épinard (HYEON et al., 1982) ou le test Microtox (RETEUNA et al., 1989) ce qui semble logique compte tenu de la spécificité d'action des triazines (Cf tableau XXII).

Dans le cas du propanil, les bioélectrodes algales sont aussi plus sensibles que le test d'inhibition d'activité photosynthétique développé par HYEON et al. (1982). La C.I. 50 obtenue avec le biocapteur est de 0,50 mg/l ; cette valeur est plus élevée que celle rapportée par STRATTON (1987) pour des essais d'inhibition de croissance algale.

Une variation importante de sensibilité aux ions cyanures a été constatée selon l'espèce algale retenue comme biocatalyseur. La production d'oxygène chez *Selenastrum capricornutum* et *Scenedesmus subspicatus* a été inhibée de moitié environ par une addition de 1 mg/l, tandis qu'une concentration de 3,3 mg/l n'a pas perturbé l'activité photosynthétique chez *Chlorella vulgaris*. Les tests algues classiques utilisant d'autres critères de mesure tels que numération cellulaire ou fluorescence ont indiqué, par contre, que la sensibilité de ces 3 chlorophycées était pratiquement identique après 3 jours (Cf tableau XXII) : ce qui laisse à penser que la chaîne photosynthétique ne serait pas le principal système biologique affecté par les cyanures chez *Chlorella vulgaris* contrairement aux autres

espèces algales testées. Chez cette algue, les systèmes rédox de la respiration cellulaire pourraient être également inhibés. Si la respiration est inhibée par les cyanures, il y aura une absence de consommation d'oxygène alors que les systèmes photosynthétiques restent fonctionnels. Ceci peut expliquer qu'à court terme, le taux d'oxygène mesuré à l'électrode reste élevé ; par contre, la toxicité s'exprimera à plus long terme suite à la diminution de la charge énergétique cellulaire consécutive à l'inhibition de la respiration. Cette sensibilité élevée de *Selenastrum capricornutum* et *Scenedesmus subspicatus* pourrait s'expliquer par l'existence d'une respiration insensible aux cyanures chez ces deux espèces.

Nous avons observé, en revanche, pour le cuivre et le mercure des variations très importantes entre bioélectrodes algales et tests algues. Ces tests d'inhibition de croissance algale (VASSEUR et al., 1988 ; STRATTON, 1987), l'essai d'inhibition de production d'oxygène chez *Chlamydomonas Reinhardii* (OVERNELL, 1975) ainsi que le test Microtox (RETEUNA et al., 1989) se sont révélés beaucoup plus sensibles que les bioélectrodes. Nous avons émis l'hypothèse que des phénomènes de spéciation pouvaient être responsables de cette faible sensibilité par création d'un micro-environnement alcalin au contact des bioélectrodes. Des mesures de variation du pH lors des flashes lumineux, ainsi que des essais de toxicité avec un pH maintenu à une valeur de 5 n'ont pas permis de confirmer cette hypothèse.

Il semble plus probable que les métaux réagissent avec les protéines et les polysaccharides de la paroi algale et se fixent sur les groupements COO^- , OH^- , SH ou NH_2 .

Les cellules algales sont réparties en couches superposées sur la membrane de filtration au contact de la cathode, et ne possèdent donc pas la même efficacité en ce qui concerne le taux d'oxygène libéré. D'une part, la répartition de la lumière fournie par la diode varie selon la position des cellules et d'autre part, le rapport quantité d'oxygène réduit à la cathode / quantité d'oxygène dégagé n'est pas identique pour toutes les cellules. Pour les plus proches de la cathode, 100% de l'oxygène dégagé va être réduit ; mais pour les cellules algales des couches les plus éloignées (couches externes), on peut raisonnablement supposer qu'une partie seulement de l'oxygène produit sera réduit à la cathode. Inversement les couches externes sont directement exposées aux rayonnements lumineux et

leur activité photosynthétique peut être plus importante que celle des couches internes.

Nous avons noté un temps de réponse assez lent des bioélectrodes aux métaux ; il est possible d'avancer que le métal se fixe, en premier lieu, sur les cellules des couches externes avant d'atteindre les couches internes : "couches efficaces". Ceci explique ainsi le décalage de temps préalable à l'enregistrement d'un effet d'inhibition de l'activité photosynthétique avec ces métaux.

Il est possible de remédier en partie à cet inconvénient en optimisant la concentration algale au contact de la cathode. Plus cette concentration sera faible, plus la sensibilité sera élevée. Les essais effectués sur le cuivre ont montré effectivement qu'en diminuant la population algale immobilisée à la cathode, on augmentait la sensibilité de l'électrode. Un compromis doit néanmoins être trouvé entre sensibilité et amplitude du courant mesuré. Le signal enregistré doit être suffisamment important pour éviter les phénomènes d'interférences et rester supérieur au bruit de fond de l'appareillage.

7.3 Application *in situ* du biocapteur à oxygène

7.3.1 Influence de la configuration du capteur

Le travail réalisé ne représente que la première étape nécessaire à la mise au point d'un biocapteur algal. Cette première phase est indispensable pour démontrer la faisabilité du système et son intérêt pour la détection, en temps réel, de toxiques agissant sur le système photosynthétique. Elle permet aussi d'identifier les aspects d'ordre technique et méthodologiques pouvant constituer des points de faiblesse du système, susceptibles d'en limiter les performances.

Un point important a concerné la position de la source lumineuse qui excite les algues unicellulaires immobilisées. Dans le système actuel, le milieu à analyser circule entre les électrodes et la diode émettrice (Cf figure 7). Le faisceau lumineux peut donc être atténué par une modification de couleur ou par un afflux de matières en suspension de l'effluent. La réponse des bioélectrodes en sera affectée sans pour autant que cela traduise une inhibition de l'activité photosynthétique.

Le type d'électrode à oxygène que nous avons développé est simple et peu onéreux ; mais l'addition d'électrolyte dans le milieu circulant va compliquer et alourdir l'infrastructure de l'analyseur *in situ*. Il conviendra en effet d'assortir le capteur d'un injecteur de NaCl avec mélangeur afin d'obtenir une homogénéité parfaite du flux à analyser avant passage au niveau de la membrane active. Le chlorure de sodium, à la concentration de 0,145 mM pourra entraîner des phénomènes de complexation de certains composés et modifier la biodisponibilité des toxiques.

Ces réflexions nous ont amenés à concevoir un système compact dont tous les éléments sont rassemblés dans le corps de l'électrode, qui permet d'améliorer le capteur à oxygène en remédiant à ces aspects limitants. Dans ce système, l'anode, la cathode ainsi que l'électrolyte sont séparées du milieu à tester, comme dans une électrode à oxygène de type Clark, par une membrane hydrophobe perméable à l'oxygène. L'excitation des micro-organismes est réalisée par une source lumineuse véhiculée par une fibre optique intégrée à la sonde. Cette stimulation lumineuse interne au capteur le rend totalement indépendant des modifications de coloration ou d'opacité de l'effluent. Ce système a fait l'objet d'un dépôt de brevet (n° 89 05776 PANDARD et al., 1989).

L'intégration d'une fibre optique modifie totalement la configuration du compartiment de mesure, principalement la cathode. Ces éléments devront être conçus de manière à perturber le moins possible le flux lumineux. Une cathode quadrillée (GREENBAUM, 1988) ou en forme de spirale satisferaient à un tel objectif en permettant d'illuminer la plus grande partie des micro-organismes immobilisés.

7.3.2 Contraintes liées à l'utilisation d'un réactif biologique

Les biocapteurs étudiés et proposés à des fins de contrôle toxicologique nécessitent tous une addition de composés dans le milieu à analyser, qu'il s'agisse d'une substance tampon pour maintenir un pH de réaction optimum (DORWARD et BARISAS, 1984 ; WOLFBEIS et KOLLER, 1989 ; KARUBE, 1981), d'un substrat pour évaluer la production de métabolites (GOODSON et JACOBS, 1974 ; DORWARD et BARISAS, 1984 ; WOLFBEIS et KOLLER, 1989 ; KARUBE, 1981) ou des deux composés simultanément. Ces conditions, nécessaires au bon fonctionnement du capteur augmentent la complexité de l'analyseur.

Outre une sensibilité aux variations de pH, la composante biologique du biocapteur est également sensible aux modifications de température, force ionique et oxygénation du milieu à analyser. Les variations de ces paramètres vont influencer sur la réponse du capteur aux substances toxiques. Il conviendra donc de s'assurer que ces paramètres n'interfèrent pas avec les mesures de toxicité en contrôlant et éventuellement en ajustant leurs valeurs à un niveau donné dans le milieu à analyser avant passage au niveau de la membrane active.

Pour présenter une durée de validité suffisante, le matériel biologique doit être régénéré par des solutions appropriées ou par l'apport d'un minimum de nutriments s'il s'agit de réactifs cellulaires : ceci va encore accroître la complexité de l'analyseur. S'il s'avère que cette régénération ne peut pas se faire pendant que le système est opérationnel, il sera nécessaire de disposer d'un double circuit pour assurer la continuité du contrôle, l'un des deux capteurs restant fonctionnel pendant que l'autre se régénère.

Les organismes végétaux sont des organismes peu exigeants au plan nutritionnel ; leur maintenance est aisée. Les biocapteurs à algues immobilisées présentent des avantages indéniables, de ce point de vue, par rapport aux autres capteurs cellulaires. Ils répondent aux critères de

simplicité requis pour des applications en routine et *in situ*. Leur sensibilité pour la détection de substances toxiques au niveau photosynthétique justifie que ces biocapteurs soient retenus pour des études de validation sur le terrain.

Un prototype, sur la base du système breveté, est en cours de réalisation : l'appareil devrait être opérationnel au cours des prochains mois pour l'étape de validation *in situ*.

Cette phase de validation de l'ensemble du système, comprenant le biocapteur doté de ces systèmes de régulation dont il conviendra de vérifier le bon fonctionnement dans des conditions réelles d'utilisation, est indispensable. Mais il ne faut pas se cacher que cette phase est longue, délicate et tout aussi difficile que l'étape de faisabilité.

CHAPITRE 8

CONCLUSIONS

Notre étude a concerné la mise au point d'un capteur biologique à réponse rapide, de configuration simple et utilisable comme indicateur de l'impact des micropolluants en milieu hydrique. Les espèces algales unicellulaires, employées comme biocatalyseur sont des organismes représentatifs des espèces photosynthétiques des milieux aquatiques ; ce sont des réactifs sensibles qui représentent la majeure partie des producteurs primaires de ces milieux. Il apparaît donc essentiel de connaître et prévenir l'impact des xénobiotiques à leur niveau.

L'activité photosynthétique est un processus fondamental et spécifique des espèces végétales. Elle est aisément mesurable par le suivi du flux d'électrons émis au niveau des chloroplastes ou par quantification de l'oxygène dégagé. Deux dispositifs reposant sur ce principe ont été étudiés ; ils utilisent des algues eucaryotes immobilisées au contact étroit d'un détecteur électrochimique pour mesurer l'activité de cette voie métabolique. Cette association étroite du matériel biologique et du détecteur est spécifique des biocapteurs ; elle permet d'obtenir une réponse de l'appareil en temps réel et d'envisager ainsi la mise en place de systèmes d'alerte pour le contrôle de la toxicité *in situ*. Différentes espèces algales ont été utilisées lors de ces essais, espèces dulcaquicoles d'une part : *Chlorella vulgaris*, *Selenastrum capricornutum*, *Scenedesmus subspicatus* et marines d'autre part : *Dunaliella bioculata*, *Skeletonema costatum*, *Phaeodactylum tricornutum*.

La mesure du flux d'électrons chez ces algues eucaryotes n'a pu être réalisée qu'en utilisant des dérivés des quinones, molécules électro-actives, qui agissent sur la chaîne de transfert électronique au niveau de Q_B comme accepteurs terminaux d'électrons et les transfèrent à l'électrode.

La *p*-benzoquinone, dans les conditions d'utilisation du capteur, s'est révélée très toxique pour les cellules algales. Le capteur, même s'il s'est avéré sensible pour la détection d'herbicides (urées substituées, triazines, anilides, benzonitriles) a présenté une durée de vie courte, limitée à quelques heures. Un tel système à médiateur n'est donc pas applicable pour le contrôle de la pollution des milieux hydriques. La

maintenance serait beaucoup trop lourde pour que ce capteur soit utilisé comme système d'alerte.

Le second système étudié qui détecte la production d'oxygène de micro-algues immobilisées est apparu beaucoup plus performant ; il semble pouvoir être retenu en vue du développement d'un système d'alerte aux pollutions hydriques accidentelles. Ce biocapteur à oxygène a fait preuve d'une longévité de plusieurs jours, d'une sensibilité satisfaisante aux micropolluants qui agissent sur le système photosynthétique comme les urées substituées, triazines, anilides et les cyanures. Le domaine d'utilisation de ce biocapteur, de par la conception de l'électrode, est limité aux substances présentant une toxicité spécifique pour les espèces végétales.

La réponse des bioélectrodes à O_2 aux toxiques organiques est rapide. Elle est plus lente vis-à-vis des toxiques minéraux comme le cuivre et le mercure. La sensibilité du capteur est également plus faible pour les métaux ; mais une amélioration peut être apportée en jouant sur le taux de cellules algales immobilisées sur la membrane active.

Des essais de simulation réalisés à l'aide d'effluents industriels prélevés avant rejet dans l'environnement ont mis en évidence l'applicabilité de ce système pour évaluer le caractère toxique des rejets d'usines testés.

L'ensemble de ces essais a démontré la faisabilité d'une bioélectrode à algues immobilisées et son intérêt pour la détection en temps réel de toxiques agissant au niveau photosynthétique. Ces travaux ne représentent toutefois que la première étape de la mise au point d'un capteur algal.

L'ensemble de ce travail a souligné les imperfections de notre prototype de laboratoire dans la perspective d'une utilisation *in situ*. Une nouvelle configuration donc a été envisagée afin d'éliminer les inconvénients rencontrés. Ce nouveau prototype est actuellement à l'étude. Il a été breveté et devra faire l'objet d'une phase de validation *in situ* pour en éprouver la fiabilité, avant d'être appliqué comme système d'alerte en routine.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ABOU-WALY H., M.M. ABOU-SETTA, H.N. NIGG & L.L. MALLORY, 1991. Growth response of freshwater algae, *Anabaena flos-aquae* and *Selenastrum capricornutum* to atrazine and hexazinone herbicides. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 46, p 223-229.

AFNOR, 1979a. Effluents aqueux des raffineries de pétrole. Dosage des matières organiques en suspension dans l'eau extractibles à l'hexane. Norme NF T 90-202.

AFNOR, 1979b. Effluents aqueux des raffineries de pétrole. Dosage des hydrocarbures totaux. Norme NF T 90-203.

AFNOR, 1984a. Dosage de la chlorophylle a et des phéopigments par spectrométrie d'absorption moléculaire. Norme expérimentale T 90-117.

AFNOR, 1984b. Dosage des chlorophylles a et b par chromatographie liquide haute performance. Norme expérimentale T 90-116.

AMBLARD C., P. COUTURE & G. BOURDIER, 1990. Effects of a pulp and paper mill effluent on the structure and metabolism of periphytic algae in experimental stream, *Aquatic Toxicology*, 18, p 137-162.

BAILLEZ C., C. LARGEAU, E. CASADEVALL, L.W. WANG & C. BERKALOFF, 1988. Photosynthesis, growth and hydrocarbon production of *Botryococcus braunii* immobilized by entrapment and adsorption in polyurethane foams, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 29, p 141-147.

BAUD J.P., J. HAURE & J. GARNIER, 1990. Effets de l'apport de phytoplancton (*Skeletonema costatum*) sur la croissance et les variations de la composition biochimique de la palourde japonaise (*Ruditapes philippinarum*) cultivée en marais, *Oceanis*, 16(5), p 391-408.

BECKMAN, 1981. Microtox technical note M 102.

BENNETO H.P., J.L. STIRLING, K. TANAKA & C.A. VEGA, 1983. Anodic reactions in microbial fuel cells, *Biotechnology and Bioengineering*, 25, p 559-568.

- BERNABEI M., C. CREMISINI, M. MASCINI & G. PALLESCHI, 1991, Determination of organophosphorus and carbamic pesticides with a choline and acetylcholine electrochemical biosensor, *Analytical Letters*, 24(8), p 1317-1331.
- BLAISE C., 1984, Développement de bioessais sublétaux pour les évaluations écotoxicologiques des effluents, Thèse de doctorat de l'Université de Metz, 172 p.
- BLAISE C., R. LEGAULT, N. BERMINGHAM, R. VAN COILLIE & P. VASSEUR, 1986, A simple microplate algal assay technique for aquatic toxicity assessment, *Toxicity Assessment*, 1, p 261-281.
- BONALY J. & J.C. MESTRE, 1982, Flow fluorometric study of DNA content in non proliferative *Euglena gracilis* cells and during proliferation, *Cytometry*, 2(1), p 35-38.
- BONALY J., M.H. BRE, M. LEFORT-TRAN & J.C. MESTRE, 1987, A flow cytometric study of DNA staining *in situ* in exponentially growing and stationary *Euglena gracilis*, *Cytometry*, 8, p 42-45.
- BOWYER J.R. & P. CAMILLERI, 1987, Chemistry and biochemistry of photosystem I herbicides, in "Herbicides" Progress in Pesticide Biochemistry and Toxicology vol.6, HUTSON D.H. & T.R. ROBERTS (Eds), WILEY & SONS Ltd, p 105-145.
- BOYLE T.P., 1984, The effect of enviromental contaminants on aquatic algae, in "Algae as ecological indicators", SHUBERT L.E. (Ed.), Academic Press, Orlando, p 237-256.
- BRUDWIG G.W., W.F. BECK & J.C. de PAULA, 1989, Mechanism of photosynthetic water oxydation, *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry*, 18, p 25-46.
- CALLEGARI J.P., 1989, Feu vert pour les micro-algues, *Biofutur*, Février, p 25-38.
- CALLEGARI J.P. & R. LANNOYE, 1981, Studies on the factors controlling the toxic action of cadmium on *Chlorella pyrenoidosa*, in "Photosynthesis VI : Photosynthesis and Productivity, Photosynthesis and Environment", AKOYUNOGLU G. (Ed.), Balaban International Science Services, Philadelphie, p 483-494.
- CAMPANELLA L. & M. TOMASSETI, 1989, Sensors in pharmaceutical analysis, *Selective Electrodes Review*, 11, p 69-110.

CARPENTIER R. & M. MIMEAULT, 1987, The photosynthetic partial reactions in photoelectrochemical current generation by thylakoid membranes, *Biotechnology Letters*, 9(2), p 111-116.

CEE, 1979, Directive du conseil concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives relatives à la classification, l'emballage et l'étiquetage des substances dangereuses (79/831/CEE), *Journal Officiel des Communautés Européennes*, L259, p 10-28.

CHRISTENSEN E.R., J. SCHERFIG & P.S. DIXON, 1979, Effects of manganese, copper and lead on *Selenastrum capricornutum* and *Chlorella stigmatophora*, *Water Research*, 13(1), p 79-92.

CLARK L.C., 1956, Monitoring and Control of blood and tissue oxygen tensions, *Transactions American Society Artificial Internal Organs*, 2, p 41-48.

CLARK L.C., & C. LYONS, 1962, Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery, *Annals of New-York Academy of Science*, 102, p 29-45.

CORBETT J.R., K. WRIGHT & A.C. BAILLIE, 1984, Herbicide interfering with photosynthesis, in "The biochemical mode of action of pesticides" 2^{ème} édition, Academic Press, Londres, p 50-98.

COUGHLAN M.P., KIERSTAN M.P.J., BORDER P.M. & A.P.F. TURNER, 1988, Analytical applications of immobilized proteins and cells, *Journal of Microbiological Methods*, 8, p 1-50.

COUTURE P., R. VAN COILLIE, P.G.C. CAMPBELL & C. THELLEN, 1981, Les tests de toxicité en milieu aquatique, in "Les tests de toxicité aiguë en milieu aquatique", LECLERC H. & D. DIVE (Eds), INSERM vol. 106, p 252-272.

COUTURE P., C. THELLEN, P.A. THOMPSON & J.C. AUCLAIR, 1987, Structure and function of phytoplanktonic and microbial communities in relation to industrial wastewater discharge : an ecotoxicological approach in a lotic system, *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 44(1), p 167-175.

COUTURE P., C. THELLEN & P.A. THOMPSON, 1989, Phytoplankton recovery responses at the population and community levels in a hazard and risk assessment study, *Hydrobiologia*, 188/189, p 269-276.

CUNNINGHAM A. & J.W. LEFTLEY, 1986, Application of flow cytometry to algal physiology and phytoplankton ecology, *FEMS Microbiology Reviews*, 32, p 159-164.

DAMJANOVIC A., 1969, Mechanistic analysis of oxygen electrode reactions, in "Modern Aspects of Electrochemistry" vol. 5, BOCKRIS J. O'M. & B.E. CONWAY (Eds.), Butterworths, Londres.

DE LA NOUE J. & N. DE PAUW, 1988, The potential of microalgal biotechnology : a review of production and use of microalgae, *Biotechnology Advances*, 6, p 725-770.

DETROUX L., 1975, Les herbicides et leur emploi, 3^{ème} édition, éditions DUCULOT J. S.A., Gembloux, 367 p.

DORWARD E.J. & B.G. BARISAS, 1984, Acute toxicity screening of water pollutants using a bacterial electrode, *Environmental Science and Technology*, 18(12), p 967-972.

DOUSSET, 1969, Lyophilisation en milieu non aqueux, *Revue Générale du Froid*, 2 (Février), p 239-245.

DUCRUET J.M., S. CREUSET & J. VIENOT, 1990, Kinetics of action of different photosystem II herbicides on thylakoids, *Zeitschrift fur Naturforschung*, 45c, p 348-352.

DUKE S.O., 1990, Overview of herbicide mechanisms of action, *Environmental Health Perspectives*, 87, p 263-271.

FALKOWSKI, 1977, cité par WONG & COUTURE 1986.

FERARD J.F., 1986, Aspects de la toxicité et de la biosorption du cadmium chez l'algue *Chlorella vulgaris*, Thèse d'état, Université de Metz, 222 p.

FREW J.E. & H.A.O. HILL, 1987, Electrochemical biosensors, *Analytical chemistry*, 59(15), p 933-944.

FROMME R. & G. RENGGER, 1990, Studies on herbicide binding in photosystem II membrane fragments from spinach, *Zeitschrift für Naturforschung*, 45c, p 373-378.

GADKARI D., 1987, Influence of the photosynthesis-inhibiting herbicides Goltix and Sencor on growth and nitrogenase activity of *Anabaena cylindrica* and *Nostoc muscorum*, *Biology and Fertility of Soils*, 3, p 171-177.

GAISFORD W.C., N.J. RICHARDSON, B.G.D. HAGGET & D.M. RAWSON, 1991, Microbial biosensors for environmental monitoring, *Biochemical Society Transactions*, 19, p 15-18.

GEA J., 1980, Contribution à la mise au point de tests d'écotoxicité statiques et dynamiques - Application à l'étude du cuivre, Thèse de Docteur Ingénieur, CNAM Metz (chimie industrielle), 189 p.

GOODSON & JACOBS, 1974, cités par NEUJAHR 1984.

GOVINDJEE & W.J. COLEMAN, 1990, How plants make oxygen, *Scientific American*, 262 (2), p 50-58.

GREENBAUM E., 1988, Method and apparatus for non destructive *in vivo* measurement of photosynthesis, U.S. Patent n° 4 789 436.

GRIZEAU D. & J.M. NAVARRO, 1986, Glycerol production by *Dunaliella tertiolecta* immobilized within Ca-alginate beads, *Biotechnology Letters*, 8, p 261-264.

GUDIN C., 1989, Les micro-algues en France et en Europe, *Biofutur*, Février, p 39-40.

GUILBAULT G.G & J.H. LUONG, 1989, Biosensors : current status and future possibilities, *Selective Electrode Review*, 11, p 3-16.

HALE P.D., T. INAGAKI, H.I. KARAN, Y. OKAMOTO & T.A. SKOTHEIM, 1989, A new class of amperometric biosensor incorporating a polymeric electron-transfer mediator, *Journal of the American Chemical Society*, 111, p 3482-3484.

HANSON O. & T. WYDZYNSKI, 1990, Current perceptions of photosystem II, *Photosynthesis Research*, 23, p 131-162.

HARPER R.D., 1986, cité par ROBINSON et al., 1986.

HASSAL K.A., 1982, The chemistry of pesticides : their metabolism, mode of action and uses in crop protection, Verlag Chemie, Weinheim, 372 p.

HIGGINS I.J. & C.R. LOWE, 1987, Introduction to the principles and applications of biosensors, *Philosophical Transaction of the Royal Society of London*, B 316, p 3-11.

HIKUMA, KUBO, YATSUDA, KARUBE & SUZUKI, 1979, cités par SCHMID & KARUBE, 1988.

HILPERT R., M.H. ZENK & F. BINDER, 1989, Biosensors for the detection of heavy metal ions, in "Biosensors Applications in Medecine, Environmental Protection and Process Control", SCHMID R.D. & F. SCHELLER (Eds), VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, p 367-370.

- HITCHMAN M.L., 1978, Measurement of dissolved oxygen, Wiley, New York, 260 p.
- HYEON S.B., M. NISHIDA, A. OHSAKA, J.M. KIM & A. SUZUKI, 1982, A simple bioassay for chemicals active to the photosynthetic or respiratory systems of plants, *Agricultural and Biological Chemistry*, 46(3), p 811-812.
- KARUBE I., S. MITSUDA, T. MATSUNAGA & S. SUZUKI, 1977, Microbial Electrode BOD Sensors, *Biotechnology and Bioengineering*, 19, p 1535-1547.
- KARUBE I., T. MATSUNAGA, T. NAKAHARA & S. SUZUKI, 1981, Preliminary screening of mutagens with a microbial sensor, *Analytical Chemistry*, 53, p 1024-1026.
- KARUBE I., T. NAKAHARA, T. MATSUNAGA & S. SUZUKI, 1982, Salmonella electrode for screening mutagens, *Analytical Chemistry*, 54, p 1725-1727.
- KARUBE I., T. OKADA, S. SUZUKI, H. HIKUMA & T. YASUDA, 1983, Amperometric determination of sodium nitrite by a microbial sensor, *European Journal of Applied Microbiology and Technology*, 15, p 127-132.
- KARUBE I. & E. TAMIYA, 1987, Biosensors for environmental control, *Pure and Applied Chemistry*, 59(4), p 545-554.
- KATZ J.J., 1988, Photosynthesis in biotechnology - Biomimetic models, in "Biotechnology vol. 6b", REHM H.J. & G. REED (Eds), VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, p 194-211.
- KENNEDY J.F. & J.M.S. CABRAL, 1983, Immobilized living cells and their applications, *Applied Biochemistry and Bioengineering*, 4, p 189-280.
- KLAPWIJK S.P., G.P. BOLIER & J. VAN DER DOES, 1989, The applications of algal potential tests (AGP) to the canals and lakes of western Netherlands, *Hydrobiologia*, 188/189, p 189-199.
- KOJIMA Y., Y. NINOMI, S. TSUBOI, T. HIYAMA & H. SAKURAI, 1987, Destruction of photosystem I iron-sulfur centers of spinach and *Anacystis nidulans* by mercurials, *Botanical Magazine Tokyo*, 100, p 243-253.
- KOSTYAEV V. YA., 1980, Effect of some heavy metals on cyanobacteria, *Mikrobiologiya*, 49(5), p 821-824.
- KRATKY B.A. & G.F. WARREN, 1971a, A rapid bioassay for photosynthetic and respiratory inhibitors, *Weed Science*, 19(6), p 658-661.

- KRATKY B.A. & G.F. WARREN, 1971b, The use of three simple rapid bioassays on forty two herbicides, *Weed Research*, 11, p 257-262.
- KUNERT K.J. & A.D. DODGE, 1989, Herbicide-induced radical damage and antioxydative systems, in "Target Sites of Herbicide Action", BOGER P. & G. SANDMANN (Eds), CRC Press, Boca Raton, Florida, p 45-63.
- LACAZE J.C., 1987, Evaluation du degré de pollution des sédiments marins au moyen d'un test subléthal, l'effet sur l'activité photosynthétique de l'algue phytoplanctonique *Phaeodactylum tricornutum* mesurée par assimilation de ^{14}C , *Compte Rendus de l'Académie des Sciences de Paris*, 305, Série III, p 515-520.
- LAVERGNE J., 1982, Interaction of exogenous benzoquinone with photosystem II in chloroplasts : the semiquinone acts as a dichlorophenyldimethylurea-insensitive secondary acceptor, *Biochimica et Biophysica Acta*, 679, p 12-18.
- LEFORT-TRAN M., M. POUPHILE & M.H. BRE, 1988, La croissance chez Euglena - Effets de la carence en vitamine B₁₂, in "La cytométrie en flux, vol.1", METEZEAU P., X. RNOT, G. LE NOAN-MERDRIGNAC & M.H. RATINAUD (Eds), MEDSI/Mc GRAW-HILL, p 263-269.
- LEHMACHER C. & F. SCHANZ, 1989, Examination of the effect of wastewater on the productivity of lake Zürich water using indigenous phytoplankton batch culture bioassays, *Hydrobiologia*, 188/189, p 229-235.
- LE MARREC J.H. & G. LESGARDS, 1990, Applications d'une méthode d'analyse électro-enzymatique à flux continu du glucose, *Annales des Falsifications de l'expertise Chimique et Toxicologique*, 892, p 393-400.
- LINEK V., V. VACEK, J. SINKULE & P. BENES, 1988, Measurement of oxygen by membrane-covered probes : Guidelines for applications and biochemical engineering, Ellis Horwood Limited Chichester, 330 p.
- LOURIE Y., 1975, Aide mémoire de chimie analytique, Editions Mir, Moscou.
- LOWE C.R., 1985, A introduction to the concepts and technology of biosensors, *Biosensors*, 1, p 3-16.
- Mc CANN J., 1987, Biosensor basics, *Laboratory practice*, May 1987, p 16-18.
- MACHOLAN & SCHANEL, 1977, cités par NEUJAHN 1984.

- MATSUNAGA T., T. SUZUKI & R. TOMODA, 1984, Photomicrobial sensors for selective determination of phosphate, *Enzyme and Microbial Technology*, 6, p 355-358.
- METS L. & A. THIEL, 1989, Biochemistry and genetic control of the photosystem II herbicide target site, in "Target Sites of Herbicide Action", BOGER P. & G. SANDMANN (Eds), CRC Press, Boca Raton, Florida, p 1-24.
- MIMEAULT M. & R. CARPENTIER, 1989, Kinetics of photocurrent induction by a thylakoid containing electrochemical cell, *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 22, p 145-158.
- MOHANTY N., I. VASS & S. DEMETER, 1989, Copper toxicity affects photosystem II electron transport at the secondary quinone acceptor Q_B , *Plant Physiology*, 90, p 175-179.
- MORELAND D.E., 1980, Mechanisms of action of herbicides, *Annual Review of Plant Physiology*, 31, p 597-638.
- MORELAND D.E., S.C. HUBER & W.P. NOVITSKY, 1981, Interaction of herbicides with chloroplast and artificial membranes, in "Photosynthesis VI : Photosynthesis and Productivity, Photosynthesis and Environment", AKOYUNOGLU G. (Ed.), Balaban International Science Services, Philadelphia, p 521-530.
- MUALLEM A., D. BRUCE & D.O. HALL, 1983, Photoproduction of H_2 et $NADPH_2$ by polyurethane-immobilized cyanobacteria, *Biotechnology Letters*, 5(6), p 365-368.
- MUNAWAR M., I.F. MUNAWAR & G.G. LEPPARD, 1989, Early warning assays : an overview of toxicity testing with phytoplankton in the north american great lakes, *Hydrobiologia*, 188/189, p 237-246.
- MUSGRAVE, KERBY, CODD & STEWARD, 1982, cités par ROBINSON et al., 1986.
- NEUJAHN H.Y., 1984, Biosensors for environmental control, *Biotechnology and Genetic Engineering Review*, 1, p 167-186.
- NOACK U., J. BOENISCH & T. SCHNEIDER, 1989, Algae toximeter - A biosensor for water monitoring, in "Biosensors Applications in Medicine, Environmental Protection and Process Control", SCHMID R.D. & F. SCHELLER (Eds), VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, p 243-246.
- NYHOLM N., 1991, Toxic effects on algal phosphate uptake, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 10, p 581-584.

NYHOLM N. & T. KALLQVIST, 1989, Methods for growth inhibition toxicity tests with freshwater algae, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 8, p 689-703.

NYHOLM N. & B.M. DAMGAARD, 1990, A comparison of the algal growth inhibition toxicity test method with the short term ^{14}C -assimilation test, *Chemosphere*, 21(4/5), p 671-679.

ONONYE A.I., A.R. Mc INTOSH & J.R. BOLTON, 1986, Mechanism of photochemistry of p-benzoquinone in aqueous solutions 1. Spin trapping and flash photolysis electron paramagnetic resonance studies, *The Journal of Physical Chemistry*, 90, p 6266-6270.

OVERNELL J., 1975, The effect of some heavy metal ions on photosynthesis in a freshwater alga, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 5, p 19-26.

OVERNELL J., 1976, Inhibition of marine algal photosynthesis by heavy metals, *Marine Biology*, 38, p 335-342.

OWEN V.M. & A.P.F. TURNER, 1987, Biosensors : a revolution in clinical analysis, *Endeavour*, 11(2), p 100-104.

PANDARD P., J.P. FLAMBEAU, M. BERTHET & P. VASSEUR, 1989, Sonde permettant la mesure de l'activité photosynthétique d'organismes vivants comprenant une électrode à oxygène et une fibre optique intégrée, Brevet français n° 89 05776.

PARRISH P.R., 1985, Acute toxicity tests, in "Fundamentals of aquatic toxicology - Methods and applications", RAND G.M. & S.R. PETROCELLI (Eds), Hemisphere Publishing Corporation, Washington, p 31-57.

PURCELL M., R. CARPENTIER, D. BELANGER & G. FORTIER, 1990, Immobilized plant membranes as a biosensor for herbicides, *Biotechnology Techniques*, 4(5), p 363-368.

RAI L.C., J.P. GAUR & H.D. KUMAR, 1981, Phycology and heavy metal pollution, *Biological Reviews*, 36, p 99-151.

RAWSON D.M., 1988, Whole cell biosensors, *International Industrial Biotechnology*, 8(2), p 18-22.

RAWSON D.M., A.J. WILMER & M.C. CARDOSI, 1987, The development of whole cell biosensor for on line screening of herbicide pollution of surface waters, *Toxicity Assessment*, 2, p 325-340.

- RAWSON D.M., A.J. WILMER & A.P.F. TURNER, 1989, Whole cell biosensors for environmental protection, *Biosensors*, 4, p 299-311.
- RENGANATHAN M. & S. BOSE, 1989, Inhibition of primary photochemistry of photosystem II by copper in isolated pea chloroplasts, *Biochimica et Biophysica Acta*, 974, p 247-253.
- RENGER G., B. HANSUM, H. GLEITER, H. KOIKE & Y. INOUE, 1988, Interaction of 1,4-benzoquinones with photosystem II in thylakoids and photosystem II membrane fragments from spinach, *Biochimica et Biophysica Acta*, 936, p 435-446.
- RETEUNA C., P. VASSEUR & R. CABRIDENC, 1989, Performances of three bacterial assays in toxicity assessment, *Hydrobiologia*, 188/189, p 143-153.
- RIEDEL K., R. RENNENBERG, U. WOLLENBERGER, G. KAISER & F.W. SCHELLER, 1989, Microbial sensors : fundamentals and application for process control, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 44, p 85-106.
- RIPPKA R., J. DERULLES, J.B. WATERBURY, M. HERDMAN & R.Y. STANIER, 1979, Generic assignments strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria, *Journal of General Microbiology*, 111, p 1-61.
- ROBERT S., P. VASSEUR & D. DIVE, 1990, Combined effects between atrazine copper and pH on target and non target species, *Water Research*, 24(4), p 485-491.
- ROBINSON P.K., A.L. MAK & M.D. TREVAN, 1986, Immobilized algae : a review, *Process Biochemistry*, August, p 122-127.
- RUTHERFORD A.W., 1989, Photosystem II the water-splitting enzyme, *TIBS*, 14, Juin 1989, p 227-232.
- SARTORY D.P., 1985, The determination of algal chlorophyllous pigments by high liquid chromatography and spectrophotometry, *Water Research*, 19(5), p 605-610.
- SARTORY D.P. & J.U. GROBBELAAR, 1984, Extraction of chlorophyll a from freshwater phytoplankton for spectrophotometric analysis, *Hydrobiologia*, 114, p 177-187.
- SCHMID R.D. & I. KARUBE, 1988, Biosensors and "Bioelectronics", in "Biotechnology vol 6b", REHM H.J. & G. REED (Eds.), VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, p 317-365.

- SHIOI Y., TAMAI H. & S. TSUTOMU, 1978, Effects of copper on photosynthetic electron transport systems in spinach chloroplasts, *Plant and Cell Physiology*, 19(2), p 203-209.
- SILLEN L.G. & E. MARTELL, 1964, Stability constant of metal ion complexes, supplement I, Chemical Society (London), special publication 17, 754 p.
- SIMON B., 1989, Recherches sur les réactions électrochimiques réversibles de l'oxygène applicables à la conception de nouveaux capteurs pour les mesures de concentrations, Thèse de doctorat de l'Université Paris VI, 199 p.
- SINKOVA H. & Z. SESTAK, 1989, Photoreduction of ferricyanide by immobilized chloroplasts, *Photosynthetica*, 23(4), p 682-686.
- SMITH I.C., 1985, Enzymatic test will cut costs of pesticide detection, *Bioprocessing Technology*, September, p 3-4.
- STRATTON G.W., 1987, The effects of pesticides and heavy metals towards phototropic microorganisms, *Reviews in Environmental Toxicology*, 3, p 71-147.
- SUZUKI H., N. KOJIMA, A. SUGAMA & F. TAKEI, 1990, Development of a miniature Clark-type oxygen electrode using semiconductor techniques and its improvment for practical applications, *Sensors and Actuators B*, 2, p 185-191.
- TANAKA-KITATANI Y., K. SATOH & S. KATOH, 1990, Interaction of benzoquinones with Q_A^- and Q_B^- in oxygen-evolving photosystem II particles from the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus elongatus*, *Plant Cell Physiology*, 31(7), p 1039-1047.
- THARREAU V., 1990, Systèmes biologiques pour l'épuration des métaux dans les effluents industriels, Thèse de doctorat de l'Université de Metz, 164 p.
- THEVENOT D.R. & G. REACH, 1988, Développement de biocapteurs implantables à glucose de la conception du capteur à son évaluation in vivo, Troisième colloque national de Bioélectrochimie, REYNAUD J.A. (Ed.), Aussois 3-5 Octobre 1988, p 38-43.
- THOMPSON P.A., P. COUTURE, C. THELLEN & J.C. AUCLAIR, 1987, Structure - fonction relationships for monitoring cellular stress and recovery responses with *Selenastrum capricornutum*, *Aquatic Toxicology*, 10, p 291-305.

- TRASK B.J., G.J. VAN DEN ENGH & J.H.B.W. ELGERSHUIZEN, 1982. Analysis of phytoplankton by flow cytometry, *Cytometry*, 2(1), p 258-264.
- TREBST A., 1987. The three-dimensional structure of the herbicide binding niche on the reaction center polypeptides of photosystem II, *Zeitschrift fur Naturforschung*, 42c, p 742-750.
- TRETTNAK W., M.J.P. LEINER & O.S. WOLFBEIS, 1988. Fibre optic glucose biosensor with an oxygen optrode as the transducer, *Analyst*, 113, p 1519-1523.
- TRETTNAK W. & O.S. WOLFBEIS, 1989. A fiber optic lactate biosensor with an oxygen optrode as the transducer, *Analytical Letters*, 22(9), p 2191-2197.
- TREVAN M.D. & A.L. MAK, 1988. Immobilized algae and their potential for use as biocatalysts, *TIBTECH*, 6 (Mars 1988), p 68-73.
- TURNER A.P.F., 1987. Biosensors: Principles and potential, in "Chemical Aspect of food enzymes", ANDREWS A.T. (Ed.), Royal Society of Chemistry, Londres, p 259-270.
- TURNER A.P.F., KARUBE I. & G.S. WILSON, 1987. Biosensors. Fundamentals and applications, Oxford University Press, Oxford, 767 p.
- VAN COILLIE, S.A. VISSER & P. COUTURE, 1981. Utilisation de bioessais avec des algues pour l'étude des répercussions liées à la mise en eau des réservoirs, *Annales de Limnologie*, 17(1), p 79-91.
- VAN COILLIE, P. COUTURE & S.A. VISSER, 1983. Use of algae in aquatic ecotoxicology, in "Aquatic Toxicology", NRIAGU J.O. (Ed.), Advances in Environmental Science and Technology Vol. 13, J. Wiley and Sons, New-York, p 487-502.
- VAN RENSEN J.J.S., 1982. Molecular mechanisms of herbicide action near photosystem II, *Physiologia Plantarum*, 54, p 515-521.
- VASSEUR P., J.M. JOUANY, J.F. FERARD & B. TOUSSAINT, 1981. Intérêt du dosage de l'ATP en tant que critère d'écotoxicité aiguë chez les algues, in "Les tests de toxicité aiguë en milieu aquatique", LECLERC H. & D. DIVE (Eds), INSERM vol. 106, p 207-226.
- VASSEUR P. & J.M. JOUANY, 1986. Les algues unicellulaires en écotoxicologie. Formation continue "Ecotoxicité, cancérogénicité et danger des molécules chimiques", 10-14 Mars 1986, Université de Metz.

- VASSEUR P., P. PANDARD & D. BURNEL, 1988, Influence of experimental factors on metal toxicity to *Selenastrum capricornutum*, *Toxicity Assessment*, 3, p 331-343.
- VERSCHUEREN K., 1983, Handbook of environmental data on organic chemicals, Van Nostrand Reinhold Company, New York, 2^{ème} édition, 1310 p.
- VINCKE B.J., M.L. DEVLEESCHOUWER & G.J. PATRIARCHE, 1985, Electrodes potentiométriques et ampérométriques à levures perméabilisées : détermination du L-lactate, *Analytical Letters*, 18(B5), p 593-607.
- WALSH G.E. & R.G. MERILL, 1984, Algal bioassays of industrial and energy process effluents, in "Algae as ecological indicators", SHUBERT L.E. (Ed.), Academic Press, Orlando, p 329-360.
- WATANABE E., K. TOYAMA, I. KARUBE & S. SUZUKI, 1984, Enzyme sensor for hypoxanthine and inosine determination in edible fish, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 19, p 18-22.
- WEIGEL H.J., 1985, The effect of Cd on photosynthetic reactions of isolated of mesophyll protoplasts, *Physiologia Plantarum*, 63, p 192-200.
- WOLFBEIS O.S. & E. KOLLER, 1989, Fiber optic detection of pesticides in drinking water, in "Biosensors Applications in Medicine, Environmental Protection and Process Control", SCHMID R.D. & F. SCHELLER (Eds), VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, p 221-225.
- WONG P.T.S. & P. COUTURE, 1986, Toxicity screening using phytoplankton, in "Toxicity Testing Using Microorganisms vol. II", DUTKA B.J. & G. BITTON (Eds), CRC Press, Boca Raton Florida, p 79-100.
- WONG P.T.S. & Y.K. CHAU, 1990, Zinc toxicity to freshwater algae, *Toxicity Assessment*, 5, p 167-177.
- WRIGHT S.J.L., 1978, Interaction of pesticides with micro-algae, in "Pesticide microbiology : microbial aspects of pesticide behaviour in the environment", HILL I.R. & S.J.L. WRIGHT (Eds.), Academic Press, Londres, p 535-602.
- WYDRZYNSKI T., J. ANGSTROM & T. VANNGARD, 1989, H_2O_2 formation by photosystem II, *Biochimica et Biophysica Acta*, 973, p 23-28.
- YENTSCH C.M., F.C. MAGUE, P.K. HORAN & K. MUIREAD, 1983, Flow cytometric DNA determinations of the dinoflagellate *Gonyaulax tamarensis* var. *excavata*, *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 67, p 175-183.

ANNEXES

ANNEXE I

Préparation des électrodes de graphite

Les électrodes utilisées pour les différentes expériences ont été réalisées au laboratoire. Le protocole suivi est le suivant.

Des disques de 5mm de diamètre sont découpés dans une feuille de carbone PAPYEX d'une épaisseur de 3 mm (Le Carbone Lorraine France). Ces disques sont ensuite lavés 2 fois dans l'acétone (30 min pour chaque lavage avec une légère agitation) puis ils subissent un lavage dans l'eau distillée portée à ébullition pendant une heure. Les disques ainsi préparés sont placés dans une étuve à 100°C pour séchage.

Après cette opération, les disques de PAPYEX sont placés dans des tubes d'échantillonnage en polyéthylène (ces tubes vont servir de moule pour la fabrication du corps de l'électrode). Des sections de fil électrique (0,2 mm d'épaisseur) sont scellés sur ces disques à l'aide d'une goutte de résine argent époxy conductrice (John MATTHEY Chemicals Ltd, Royston, Herts, Grande Bretagne).

Après séchage, (dans une étuve à 60°C pendant une heure) conformément à la notice du fabricant, on coule une résine qui va former le corps de l'électrode. Celle-ci correspond à un mélange de 9 volumes de résine "epon" (grade 815) pour un volume de triéthylènetétramine (catalyseur). Ces deux produits proviennent de Polysciences, Inc, Warrington, Pa, USA.

Après séchage pendant 12 heures, les électrodes solidifiées sont extraites des tubes d'échantillonnage puis, testées électriquement afin de vérifier leur conductivité et leur résistance interne.

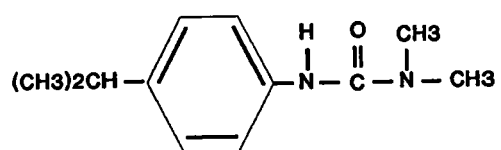
Préparation des électrodes de références

Des sections de fil d'argent d'un diamètre de 1,2 mm (BDH) sont recouvertes d'un dépôt de chlorure d'argent.

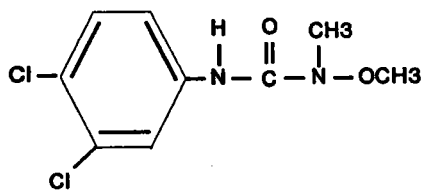
On réalise un système potentiométrique à 3 électrodes, au sein duquel la partie métallique à recouvrir est utilisée comme électrode de travail. La différence de potentiel imposée entre les électrodes est de 300 mV. Le fil d'argent, plongé dans une solution de KCl 1M, se recouvre très rapidement d'un dépôt d'AgCl. Ces électrodes sont re préparées régulièrement après élimination du dépôt précédent.

ANNEXE IIComposition du milieu LEFEBVRE et CZARDA

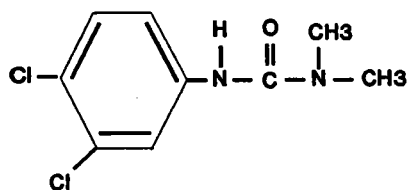
	moie/l	mg/l
<u>Eléments majeurs</u>		
Ca(NO ₃), 4H ₂ O	1.69 10 ⁻⁴	40
KNO ₃	9.89 10 ⁻⁴	100
K ₂ HPO ₄	2.30 10 ⁻⁴	40
MgSO ₄ . 7H ₂ O	1.22 10 ⁻⁴	30
<u>Eléments traces</u>		
H ₃ BO ₃	4.85 10 ⁻⁷	3.00 10 ⁻²
Mn(NO ₃) ₂ . 4H ₂ O	1.19 10 ⁻⁷	3.00 10 ⁻²
CuSO ₄ . 5H ₂ O	6.01 10 ⁻⁸	1.50 10 ⁻²
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	1.04 10 ⁻⁷	3.00 10 ⁻²
CoCl ₂ . 6H ₂ O	1.26 10 ⁻⁷	3.00 10 ⁻²
FeSO ₄ . 7H ₂ O	1.12 10 ⁻⁶	3.10 10 ⁻²
FeCl ₃ . 6H ₂ O	1.15 10 ⁻⁶	3.10 10 ⁻²
C ₆ H ₅ FeO ₇ . 5H ₂ O	2.42 10 ⁻⁶	8.12 10 ⁻¹
C ₆ H ₈ O ₂ . H ₂ O	2.30 10 ⁻⁷	3.00 10 ⁻²
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ . 4H ₂ O	2.42 10 ⁻⁸	3.00 10 ⁻²

ANNEXE IIIFormules développées des différents herbicides testésUrées substituées

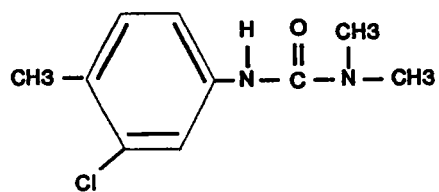
Isoproturon



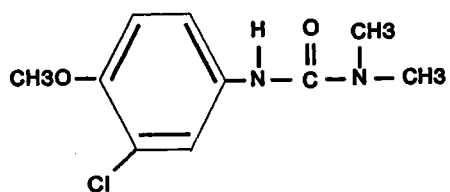
Linuron



DCMU

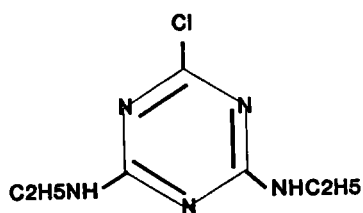


Chlortoluron

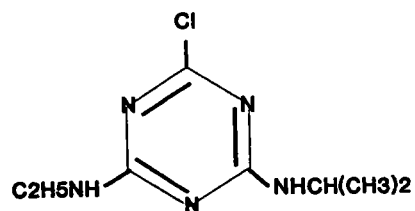


Métoxuron

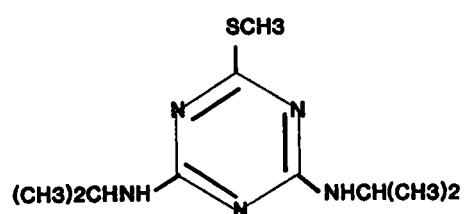
Triazines



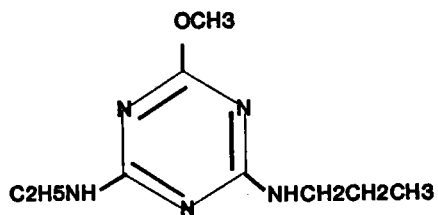
Atrazine



Simazine

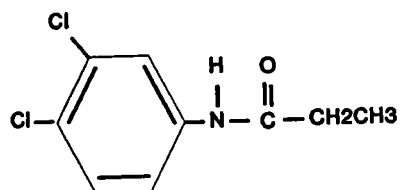


Prométryne



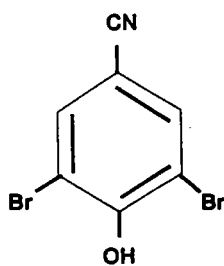
Secbuméton

Acylanilides

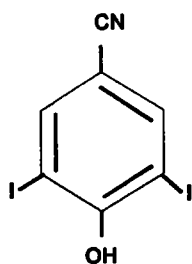


Propanil

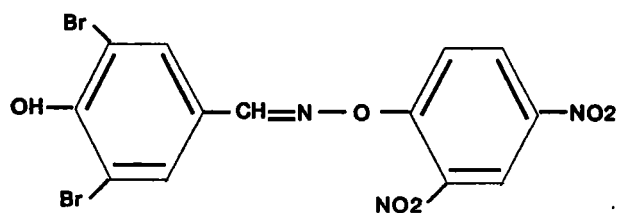
Benzonitriles



Bromoxynil

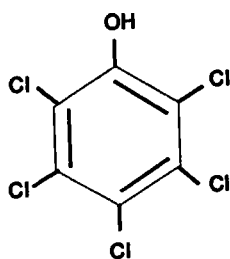


Ioxynil



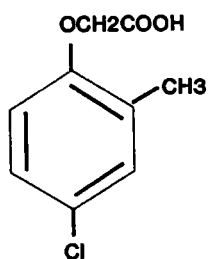
Bromophénoxime

Organochlorés



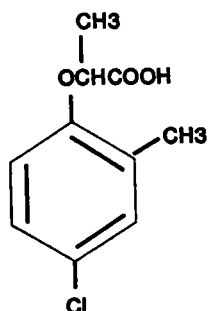
Pentachlorophénol

Acides phénoxyacétiques



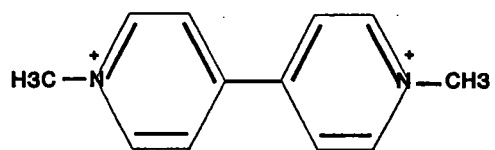
MCPA

Acides phénoxypropioniques



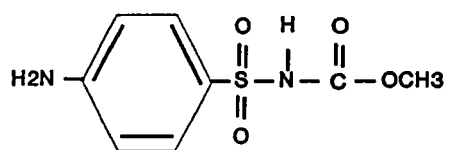
Mécoprop

Composés hétérocycliques



Paraquat dichlorure

Arylcarbammates



Asulame

ANNEXE IV

Tableau I : Pourcentages d'inhibition de production d'O₂ obtenus pour des temps de contact de 15 et 30 minutes.

Conc. mg/l	Isoproturon		Atrazine		Propanil	
	T=15min	T=30min	T=15min	T=30min	T=15min	T=30min
0,025	13,5±1,2	14,6±3,0	0	0	0	0
0,050	18,2±1,5	32,1±5,4	4,4±0,9	7,8±0,8	0	0
0,100	42,6±2,3	43,9±3,2	25,5±4,7	27,2±2,6	5,8±1,3	8,2±3,0
0,200	60,3±0,3	65,3±0,9	38,7±4,7	44,6±1,0	-	-
0,300	-	-	-	-	18,4±1,5	21,2±4,7
0,500	74,0±0,5	74,2±0,5	62,5±1,9	63,5±0,9	44,3±6,6	48,0±1,2
0,700	-	-	-	-	49,2±2,1	52,0±4,1
1,000	-	-	69,2±2,2	72,1±1,8	62,3±2,1	64,2±3,2
2,000	-	-	-	-	75,8±0,7	76,8±1,5

ANNEXE V

Valeurs des constantes de complexation utilisées lors des calculs théoriques avec le cuivre.

hydroxydes

$$\beta_1 = 10^{-7} \quad (1)$$

$$\beta_2 = 10^{-13,7} \quad (1)$$

Chlorures

$$\beta_1 = 10^{-0,98} \quad (2)$$

$$\beta_2 = 10^{-0,69} \quad (2)$$

$$\beta_3 = 10^{-0,55} \quad (2)$$

$$\beta_4 = 0 \quad (2)$$

(1) : LOURIE, 1975

(2) : SILLEN et MARTELL, 1964

La constante β tient compte de la formation de complexes successifs

$$\beta_x = \frac{(\text{Cu}^{2+}) (\text{Complexant}^-)^x}{\text{Cu}(\text{Complexant})_x}$$

ANNEXE VITableau XIV : Caractéristiques physico-chimiques des effluents

Effluent testé	Aspect de l'effluent	Coloration de l'effluent	pH mesuré
Effluent A	Phase aqueuse	Couleur brune	7,5
Effluent B	Phase aqueuse	Couleur jaune	7,7
Effluent C	Phase aqueuse	Incolore	9,0
Effluent D	Phase aqueuse	Incolore	7,3
Effluent E	Phase aqueuse	Couleur jaune clair	5,3
Effluent F	Phases aqueuse, organique, solide	Couleur brune *	8,0

* : Couleur obtenue après homogénéisation de l'effluent

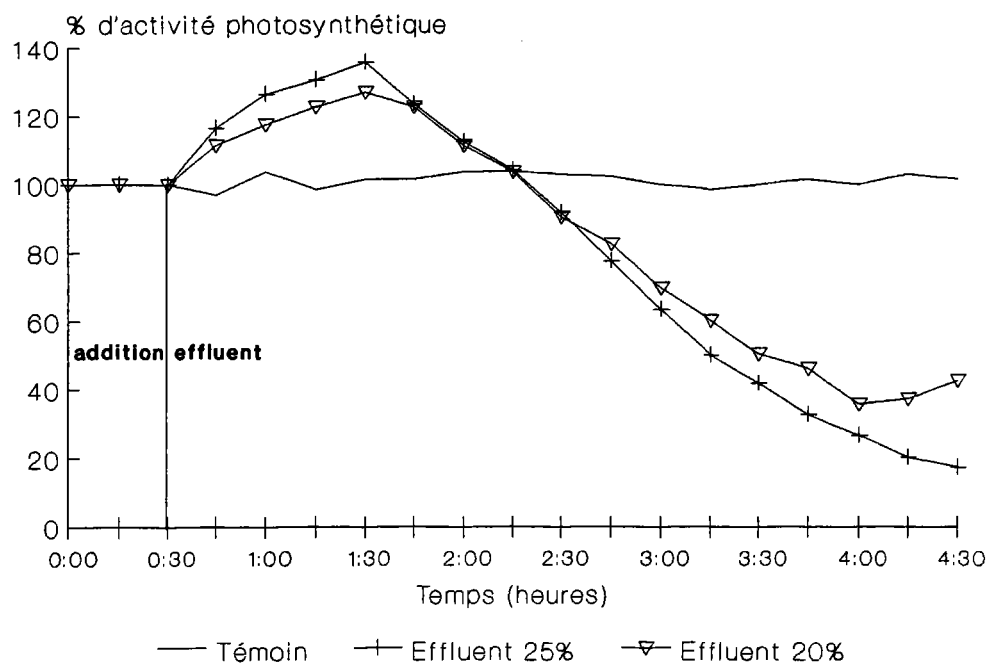


Figure A 1 : Toxicité de l'effluent A

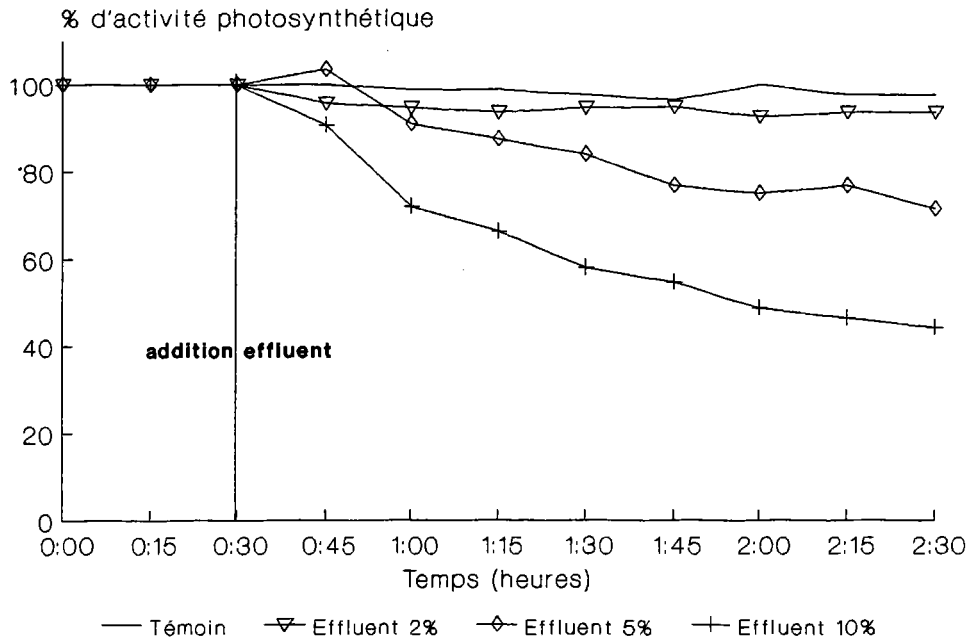


Figure A 2 : Toxicité de l'effluent C

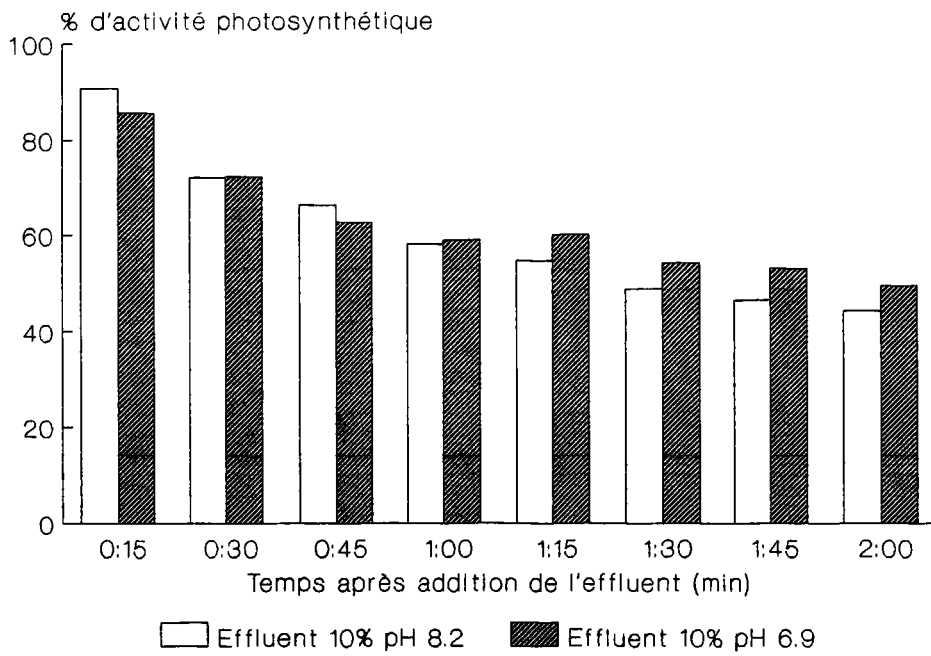


Figure A 3 : Comparaison de la toxicité de l'effluent C (à 10%) pour 2 pH différents

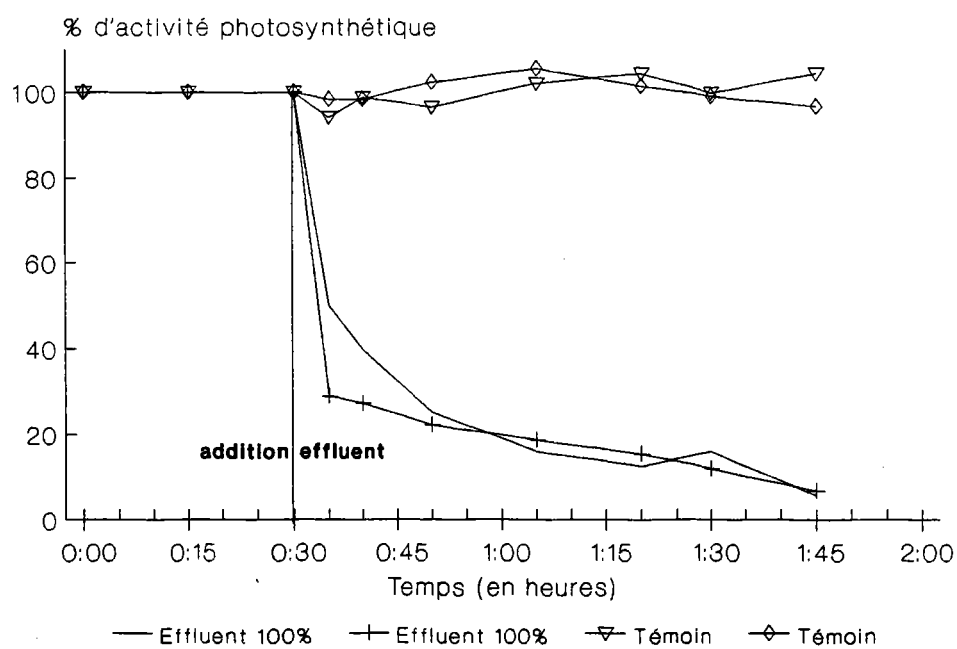
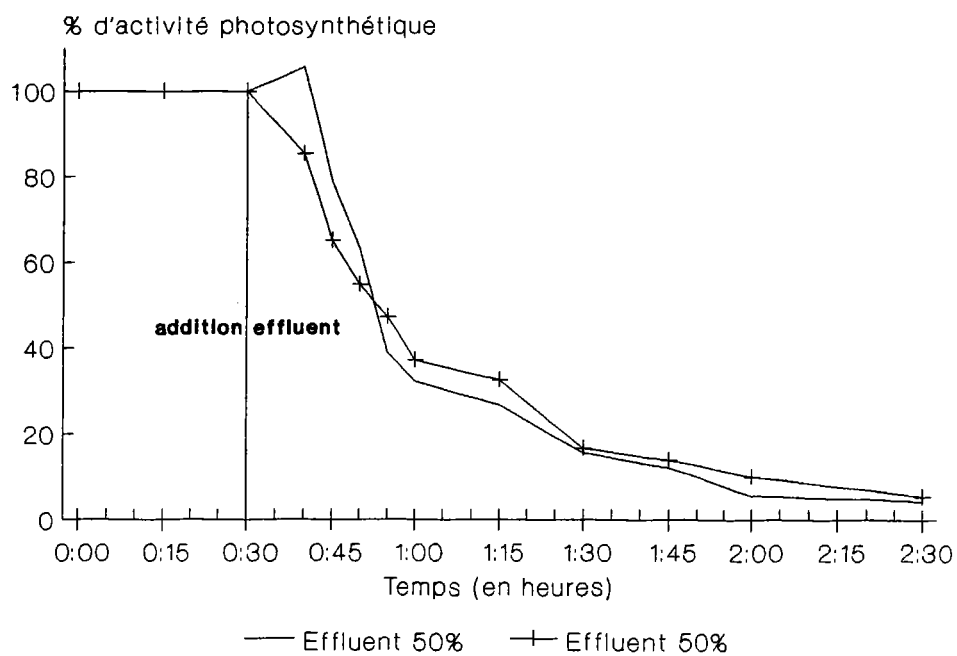


Figure A 4 : Toxicité de l'effluent E

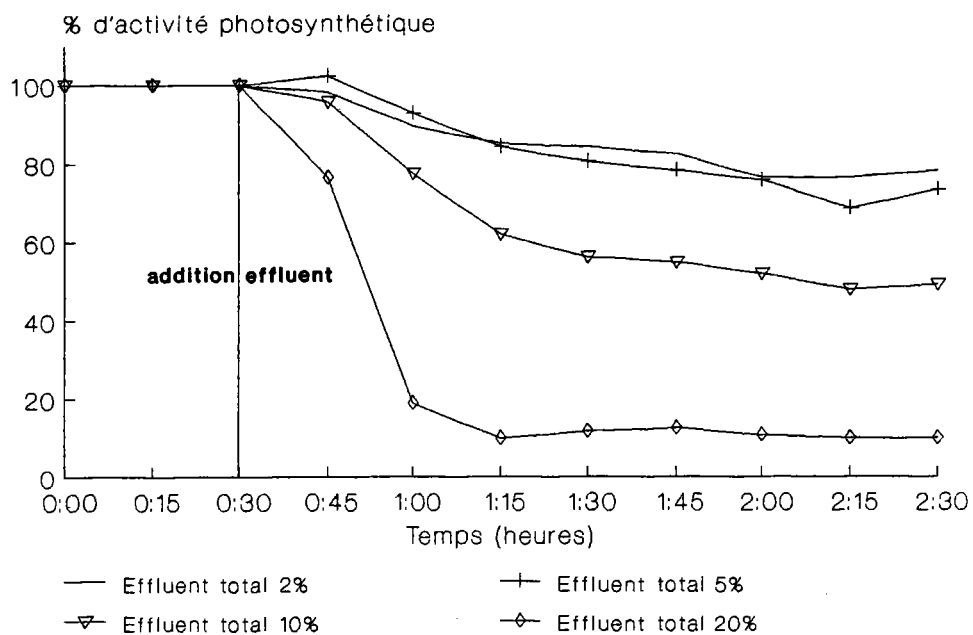


Figure A 5 (a) : Toxicité de l'effluent F1

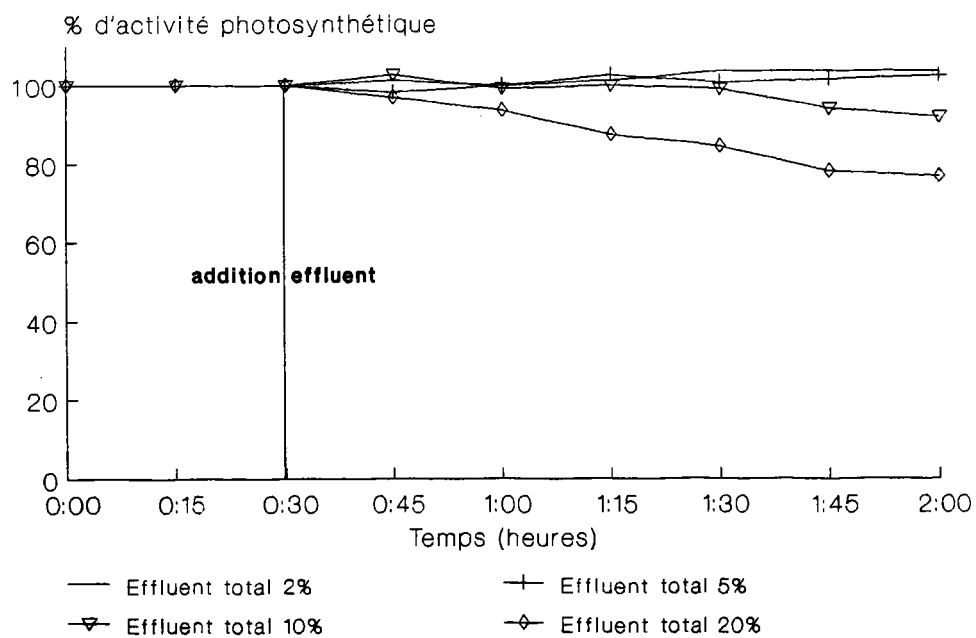


Figure A 5 (b) : Toxicité de l'effluent F2

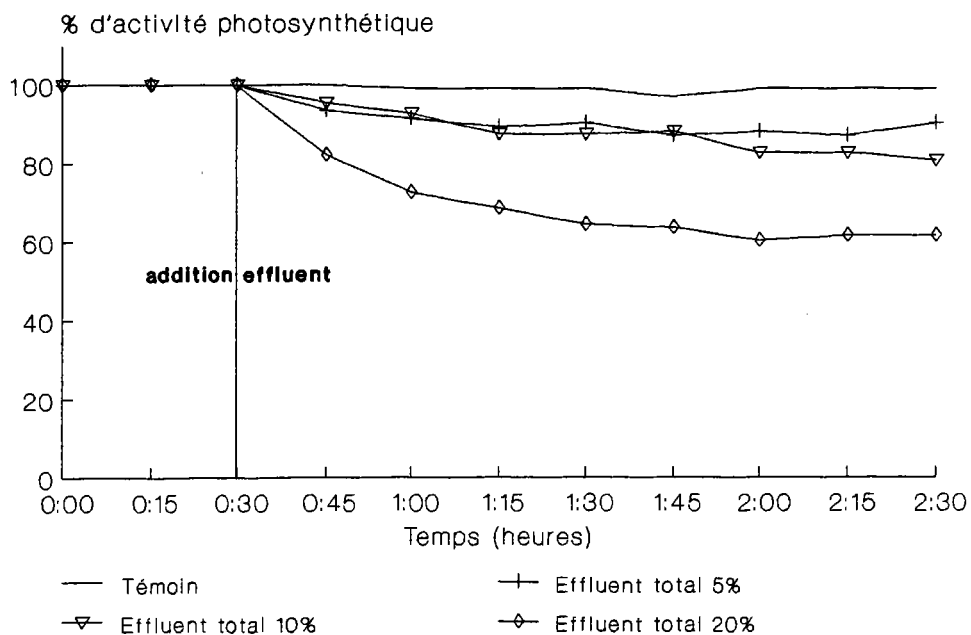


Figure A 6 (a) : Toxicité de l'effluent F3

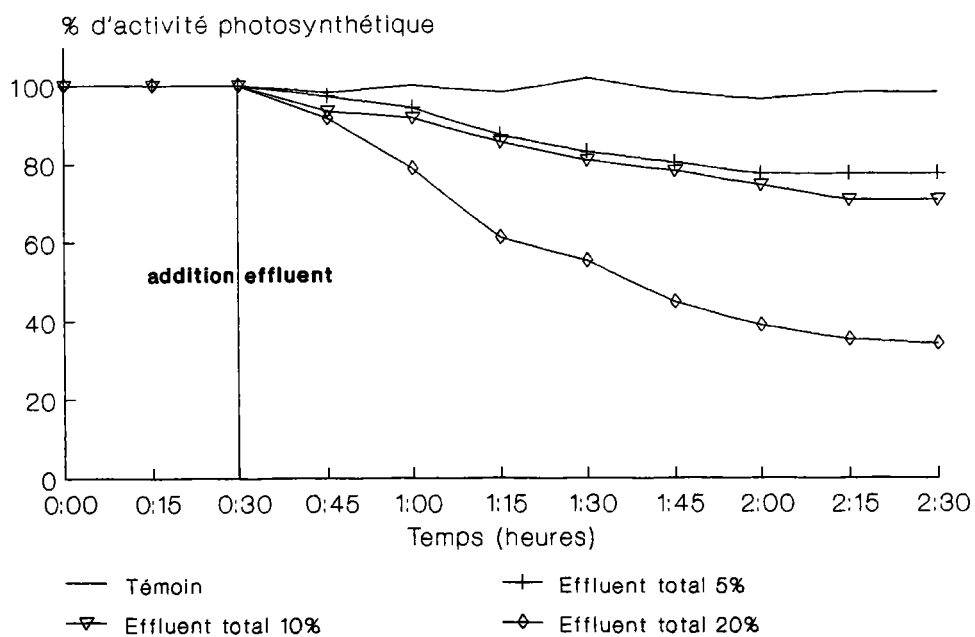


Figure A 6 (b) : Toxicité de l'effluent F4