(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle
Bureau international

(43) Date de la publication internationale
13 mai 2004 (13.05.2004)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2004/040004 A1

(51) Classification internationale des brevets[7] : C12Q 1/00, G01N 33/543, 33/487

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2003/003178

(22) Date de dépôt international :
27 octobre 2003 (27.10.2003)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
02/13439 28 octobre 2002 (28.10.2002) FR

(71) Déposants *(pour tous les États désignés sauf US)* : **UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON I** [FR/FR]; 43, Boulevard du 11 Novembre 1918, F-69622 VILLEURBANNE CEDEX (FR). **CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.)** [FR/FR]; 3, Rue Michel Ange, F-75794 PARIS CEDEX 16 (FR). **ECOLE NATIONALE DES TRAVAUX PUBLICS DE L'ETAT (ENTPE)** [FR/FR]; 3 Rue Maurice Audin, F-69120 VAULX-EN-VELIN (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants *(pour US seulement)* : **CHOVELON, Jean-Marc** [FR/FR]; 2, Place d'Helvétie, F-69130 ECULLY (FR). **DURRIEU, Claude** [FR/FR]; 54, Chemin de Ronde, F-01700 MIRIBEL (FR). **CHOUTEAU, Céline** [FR/FR]; 14, Rue du Boulevard, F-69100 VILLEURBANNE (FR).

(74) Mandataire : **SARLIN, Laure**; Cabinet Beau de Lomenie, 51, avenue Jean Jaurès, B.P. 7073, F-69301 Lyon Cedex 07 (FR).

(81) États désignés *(national)* : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés *(régional)* : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :
— *avec rapport de recherche internationale*
— *avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues*

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) **Title:** MULTIENZYMATIC CONDUCTIMETRIC OR POTENTIOMETRIC BIOSENSOR WITH UNICELLULAR ALGAE, DETECTION METHOD USING SAME

(54) **Titre :** BIOCAPTEUR CONDUCTIMETRIQUE OU POTENTIOMETRIQUE MULTI-ENZYMATIQUE A ALGUES UNICELLULAIRES, PROCEDE DE DETECTION METTANT EN OEUVRE UN TEL BIOCAPTEUR

(57) **Abstract:** The invention concerns a multienzymatic biosensor for detecting specific pollutants potentially present in an aqueous liquid, comprising a conductimetric or potentiometric sensor, with a reference electrode and a measuring electrode whereon living unicellular algae are immobilized, said algae comprising different reactive membrane-bound enzymes, the detectable pollutants being capable of inhibiting the enzymatic activity of one of the membrane-bound enzymes, as well as detection methods using said biosensors.

(57) **Abrégé :** Biocapteur muti-enzymatique, destiné à détecter la présence éventuelle de polluants spécifiques au sein d'un liquide aqueux, comportant un capteur conductimétrique ou potentiométrique, avec une électrode de référence et une électrode de mesure sur laquelle des algues unicellulaires vivantes sont immobilisées, ces algues comprenant différentes enzymes membranaires réactives, les polluants détectables ayant le pouvoir d'inhiber l'activité enzymatique de l'une des enzymes membranaires, ainsi que les procédés de détection mettant en oeuvre de tels biocapteurs.

WO 2004/040004 A1

BIOCAPTEUR CONDUCTIMETRIQUE OU POTENTIOMETRIQUE MULTI-ENZYMATIQUE A ALGUES UNICELLULAIRES, PROCEDE DE DETECTION METTANT EN ŒUVRE UN TEL BIOCAPTEUR

La présente invention concerne le domaine technique des biocapteurs. En particulier, l'invention a pour objet un biocapteur électrochimique multi-enzymatique à algues unicellulaires, ainsi qu'un procédé pour détecter la présence éventuelle de polluants au sein d'un liquide aqueux mettant en œuvre ledit biocapteur.

Un biocapteur est un outil qui permet de transformer un phénomène biochimique en un signal électrique. Il est composé d'un élément biologique appelé également biorécepteur, ainsi que d'un transducteur qui convertit en signal électrique la modification biochimique intervenue au niveau du biorécepteur. Il existe différents types de biocapteurs qui diffèrent de par la nature de leur biorécepteur, mais également de leur transducteur.

Dans le domaine de l'environnement, il est très important de disposer d'outils capables de détecter la présence de polluants ou de substances toxiques au sein des milieux aqueux, tels que les écosystèmes aquatiques, l'eau des stations d'épuration, les effluents industriels. En effet, le problème de la pollution de l'eau, par exemple, par les pesticides et les ions de métaux lourds devient de plus en plus critique. Pour limiter l'agression des polluants sur les écosystèmes, il convient de mettre au point des outils de détection précoces capables de les détecter rapidement, qui soient en outre facilement transportables sur sites à surveiller et qui présentent des coûts de revient relativement faibles.

La détection de faibles concentrations de polluants dans le domaine de l'environnement demande des méthodes d'analyse précises et sensibles. Les méthodes chromatographiques ou spectroscopiques sont largement utilisées, mais ces méthodes sont onéreuses, longues à mettre en œuvre et surtout présentent l'inconvénient majeur de ne détecter que certaines espèces qui sont spécifiquement recherchées. De ce fait, des produits toxiques peuvent encore être présents dans les échantillons sans qu'on soit en mesure de les identifier.

D'autres approches pour le contôle de la pollution de liquides aqueux ont été développées. L'écotoxicité sur des organismes vivants allant des truites arc-en-ciel aux bactéries bioluminescentes est largement utilisée. Ces méthodes sont mises en

œuvre non pas pour identifier des polluants particuliers, mais pour donner une idée de la toxicité d'un mélange vis-à-vis de l'organisme vivant utilisé comme bioindicateur. Dans ce cas, le temps de réponse est parfois long, c'est-à-dire qu'il peut atteindre plusieurs jours, et les mesures sont cantonnées aux laboratoires.

Il serait donc intéressant de disposer d'autres techniques plus appropriées. Les inventeurs ont eu l'idée de développer de nouveaux biocapteurs aptes à détecter différents types de polluants au sein d'un liquide aqueux. Parmi les biocapteurs pour la détection de polluants, il existe des biocapteurs dits mono-enzymatiques. Une seule enzyme est immobilisée sur ces biocapteurs, de sorte qu'ils ne sont sensibles qu'à une seule classe d'inhibiteurs spécifiques de la dite enzyme et ne peuvent donc pas être utilisés pour détecter la présence de nombreux polluants présents simultanément dans les liquides aqueux à étudier. De plus, les enzymes pouvant être utilisées dans ce type d'applications sont en nombre limité du fait de leur instabilité et de leur prix prohibitif. Ce type de biocapteurs mono-enzymatiques ne sont donc pas adaptés aux applications environnementales.

D'autres biocapteurs utilisent des cellules entières en tant que biorécepteur tels que différents microorganismes comme les bactéries ou les algues. On pourra se référer à SENSOR & ACTUATORS, 1996, 1334, 270-275 qui décrit des biocapteurs optiques basés sur des mesures de perturbation du métabolisme algale au niveau de ses fonctions générales comme la photosynthèse et la fluorescence. Dans ce cas, les mesures réalisées ne sont pas basées sur l'activité enzymatique des cellules entières utilisées.

Claude DURRIEU *et al* décrivent dans Ecotoxicology and Environmental Safety, 2002, 51, 206-209, un biocapteur à détection optique sur lequel des algues unicellulaires sont immobilisées. L'activité enzymatique de l'alcaline phosphatase est mesurée grâce à un fluorimètre et permet de détecter la présence de métaux lourds. Néanmoins, ces mesures nécessitent l'utilisation d'un fluorimètre rendant le capteur difficilement transportable. De plus, un tel biocapteur n'est pas adapté pour la détection de métaux lourds présents en faible concentration, par exemple inférieure à 10 ppb.

Dans ce contexte, l'un des objectif de la présente invention est de fournir un nouveau dispositif capable de détecter la présence éventuelle de polluants au sein d'un liquide aqueux, ce dispositif se devant de répondre aux exigences suivantes :

- être capable de détecter et d'identifier, de façon sélective, différents polluants présents au sein des milieux aqueux à contrôler,
- être capable d'effectuer des mesures instantanées et *in situ*,
- se présenter sous une forme miniaturisée facile à mettre en œuvre sur le terrain et aisément transportable,
- être stable et capable d'effectuer des mesures en continu,
- être facile à fabriquer et à un coût de revient relativement faible,
- être capable de détecter des faibles quantités de polluants, notamment de l'ordre du ppb.

L'invention a donc pour objet un biocapteur multi-enzymatique, destiné à détecter la présence éventuelle de polluants spécifiques au sein d'un liquide aqueux, comportant un capteur conductimétrique ou potentiométrique avec une électrode de référence et une électrode de mesure sur laquelle des algues unicellulaires vivantes sont immobilisées, ces algues comprenant différentes enzymes membranaires réactives, les polluants détectables ayant le pouvoir d'inhiber l'activité enzymatique de l'une des enzymes membranaires.

Un autre aspect de l'invention concerne un procédé pour détecter la présence éventuelle de polluants au sein d'un liquide aqueux, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

a) mettre un biocapteur tel que défini ci-dessus en contact avec le liquide aqueux, puis

b) mesurer l'éventuelle inhibition de l'activité enzymatique d'une première enzyme membranaire des algues unicellulaires pour en déduire la présence de polluants spécifiques responsables de l'inhibition détectée,

c) répéter l'étape b) pour une deuxième enzyme membranaire.

Les inventeurs ont mis en évidence qu'il était possible d'obtenir des biocapteurs particulièrement performants en associant un capteur conductimétrique ou potentiométrique à des algues unicellulaires vivantes. En effet, les algues unicellulaires présentent une grande sensibilité aux polluants liée à leur pouvoir

accumulateur important. Par ailleurs, ces organismes sont très faciles à manipuler et à cultiver. De plus, les algues unicellulaires sont des organismes particulièrement robustes dont la taille et la forme facilitent leur immobilisation sur le capteur électrochimique. Surtout, les algues unicellulaires possèdent naturellement différents types d'enzymes membranaires qui pourront être sollicitées pour la détection de différents polluants spécifiques, même présents en faible concentration. Ces enzymes se trouvant dans leur milieu naturel, elles présentent de ce fait une très bonne stabilité.

Par ailleurs, l'utilisation de capteurs électrochimiques, du type conductimétrique ou potentiométrique, permet une mesure rapide pouvant être effectuée directement sur le terrain. De plus, les capteurs conductimétriques ou potentiométriques utilisés sont disponibles dans le commerce à un faible coût de revient.

Le biocapteur selon l'invention comprend donc des algues unicellulaires vivantes immobilisées sur la surface du biocapteur destinées à être mises en contact avec le liquide aqueux à étudier. On pourra, par exemple, utiliser des algues unicellulaires de la famille des chlorophycées, par exemple des algues *Scenedesmus subspicatus, Pseudokirchneriella subcapitata* ou de préférence *chlorella vulgaris,* ou encore de la famille des euglénophycées ou des cyanophycées.

Ces algues unicellulaires sont immobilisées sur l'électrode de mesure d'un capteur électrochimique conforme à l'invention. Cette immobilisation peut se faire selon tout moyen, par exemple par adsorption puis réticulation. En particulier, on pourra réaliser une membrane en combinant les cellules algales avec une substance capable de polymériser, adsorber cette membrane sur l'électrode, puis ajouter un agent réticulant ou polymérisant afin d'obtenir la réticulation de la membrane et donc l'immobilisation des algues. En tant que substance capable de polymériser, on pourra par exemple utiliser de l'albumine de sérum bovin (BSA) ou de l'alginate de calcium en combinaison avec respectivement le glutaraldéhyde ou le chlorure de calcium comme agent réticulant. L'utilisation de BSA est particulièrement préférée. De manière avantageuse, on déposera sur l'électrode un mélange homogène de cellules algales et de BSA contenant de 5 à 15 % de BSA. En particulier, il est préférable de

déposer de 1.10^3 à 10.10^3 algues/ mm^2 de surface d'électrode, et préférentiellement de 1.10^3 à 3.10^3 algues/ mm^2 de surface d'électrode.

Les algues unicellulaires présentent différentes enzymes membranaires susceptibles de réagir avec différents polluants spécifiques présents dans le liquide aqueux à étudier. En particulier, on pourra citer les enzymes phosphatases alcalines dont l'activité enzymatique est inhibée par la présence de métaux lourds, les enzymes estérases dont l'activité enzymatique est inhibée par la présence de dérivés organophosphorés et l'enzyme nitrate réductase dont l'activité enzymatique est inhibée par des ions NH_4^+. Les biocapteurs selon l'invention sont donc parfaitement adaptés pour détecter la présence et les variations de concentration de métaux lourds (Cd, Zn, Pb...) ou de pesticides organophosphorés dans des liquides aqueux.

Le principe de détection consiste à surveiller l'influence qu'a le liquide à analyser sur l'activité enzymatique des enzymes présentes au niveau de la membrane des cellules algales.

Par exemple, on sait que les métaux lourds tels que Cd, Zn, Pb se comportent comme des inhibiteurs des enzymes phosphatases alcalines. Par conséquent, en mesurant l'activité enzymatique obtenue avec le capteur en présence d'un substrat spécifique de la phosphatase alcaline à saturation, avant contact du capteur avec le milieu à contrôler et en la comparant avec l'activité enzymatique obtenue après contact avec le milieu, on en déduit si le milieu contient des métaux lourds responsables de l'inhibition de l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline observée. Bien entendu, l'enzyme membranaire doit être réactive, c'est à dire susceptible de réagir avec un substrat spécifique. Dans le cas de l'enzyme phosphatase alcaline, présente notamment dans *chlorella vulgaris*, il est nécessaire de la préparer pour la rendre réactive. Pour cela, les algues sont maintenues dans un milieu sans phosphate pendant une durée minimale de 15 jours, afin d'épuiser leur réserve en phosphate.

L'activité enzymatique est mesurée grâce au capteur conductimétrique ou potentiométrique. En effet, la réaction enzymatique entraîne des changements chimiques tels que la formation d'ions phosphates ou des variations de pH directement mesurables grâce aux capteurs conductimétriques ou potentiométriques par détection de la conductance ou du pH de la solution. Contrairement à d'autres

capteurs électrochimiques, du type ampérométrique, les capteurs conductimétriques ou potentiométriques ne nécessitent pas la présence d'espèces électroactives.

Le capteur électrochimique comportant une électrode de référence et une électrode de mesure sur laquelle des cellules vivantes algales sont immobilisées, permet de détecter les réactions chimiques intervenant au niveau des enzymes sous la forme d'un signal électrique mesurable. Ce capteur électrochimique est, par exemple, relié, par l'intermédiaire de moyens électroniques capables de traiter le signal électrique émis, à une table traçante permettant de suivre l'évolution du signal. Les types de capteurs ou électrodes pouvant être utilisés sont :

- des capteurs potentiométriques permettant de déterminer la différence de potentiel qui s'établit entre une première électrode de mesure sur laquelle les cellules algales sont déposées et une seconde électrode de référence ou,
- des capteurs conductimétriques ; le principe des capteurs conductimétriques repose sur la mesure de la conductance au niveau des cellules de détection situées à l'extrémité du capteur. Cette conductance varie lorsque des porteurs de charges hautement mobiles sont générés ou consommés par les réactions enzymatiques.

On pourra utiliser un transducteur conductimétrique constitué de deux paires d'électrodes interdigitées en platine déposées sur un substrat Si/SiO_2. Une des électrodes sert à faire la mesure tandis que l'autre joue le rôle de référence. Un tel transducteur est plongé dans la solution à tester. Le signal électrique mesuré est amplifié et reporté sur un traceur. Il est alors facile d'étudier les variations de la conductance lors de l'injection d'un réactif. Le signal tracé correspond à la différence des deux signaux émis au niveau des deux électrodes de détection.

Les capteurs potentiométriques permettent de mesurer les variations locales de pH directement relié à la concentration en ions H^+. Lors de certaines réactions enzymatiques, la libération d'ions H^+ ou OH^- peut modifier localement le pH. On pourra utiliser des électrodes à la surface desquelles des groupements SiOH sont déposés. Lors d'une réaction enzymatique, la variation de pH dans la membrane sur laquelle les algues sont immobilisées va provoquer la transformation de SiOH en SiO^- ou SiO^+H_2. Ces accumulations de charges à la surface des électrodes ionosensibles entraînent alors une variation de potentiel que l'on peut mesurer.

Les capteurs conductimétriques, de production plus simple et moins coûteuse, sont préférés aux capteurs potentiométriques.

Les avantages de tels transducteurs électrochimiques sont nombreux. Tout d'abord, ils ne possèdent pas d'électrode de référence compliquée : il suffit juste d'immobiliser sur l'électrode de référence des algues unicellulaires dépourvues d'activité enzymatique. Pour cela, on utilisera, par exemple, des algues unicellulaires préalablement chauffées à 100°C ou un mélange de milieu AFNOR T90-304, immobilisées dans les mêmes conditions que pour l'électrode de mesure. Ces transducteurs électrochimiques permettent d'obtenir des biocapteurs miniaturisés, facilement transportables et donc utilisables pour effectuer des mesures directement sur le terrain. De plus, ils sont insensibles à la lumière.

Le procédé selon l'invention est basé sur la mesure de l'inhibition de l'activité enzymatique des enzymes membranaires algales, inhibition due à la présence de polluants au sein du liquide aqueux à contrôler se comportant comme des inhibiteurs.

Selon un mode de réalisation préféré, on effectue une série de mesures de référence, lors de laquelle on détecte le signal électrique émis par le biocapteur lorsque celui-ci est mis en contact avec une concentration variable de substrat approprié de l'enzyme membranaire réactive dont on veut mesurer l'activité. De cette série de mesures, on en déduit notamment une concentration de substrat entraînant la saturation de l'activité enzymatique de l'enzyme. L'évolution du signal électrique dS en fonction de la concentration en substrat est, par exemple, tracée sur une table traçante. Ce signal électrique est représentatif de l'activité enzymatique. La saturation correspond au palier mis en évidence sur les **Fig.1** et **2**.

Cette série de mesures de référence est effectuée avant d'effectuer la mesure de détection sur le liquide à contrôler. Pour cela, on met en contact les électrodes du biocapteur avec le liquide aqueux, également nommé analyte, à contrôler. La mise en contact du biocapteur avec l'analyte à contrôler peut, par exemple, s'effectuer selon l'une des deux façons suivantes :

- soit par contact direct : dans ce cas, les électrodes sont plongées dans l'analyte à contrôler et immédiatement une concentration de substrat correspondant à la saturation de l'enzyme dont l'activité est à mesurer est introduite ;

- soit par mise en contact préalable : les électrodes sont plongées dans l'analyte à contrôler pendant un temps **t**, de préférence inférieur à 60 minutes, compris par exemple dans la gamme allant de 15 à 30 minutes, les électrodes sont retirées, puis mises en contact avec le substrat à la concentration saturante. Le temps de contact ne doit pas être trop long pour éviter que les polluants ne diffusent à travers la membrane de l'algue, ce qui risquerait d'induire la mort de l'algue. Ensuite, on mesure l'activité enzymatique obtenue, à cette concentration de substrat. L'éventuelle inhibition de l'activité enzymatique de cette enzyme est mesurée en comparant le signal électrique dS obtenu, avant contact et après contact du biocapteur avec le liquide aqueux contrôlé, à cette même concentration.

Dans le cas d'une mise en contact direct, on plonge le biocapteur dans l'analyte jusqu'à stabilisation du signal pour déterminer son amplitude $dS_{initial}$, on injecte le volume de substrat souhaité pour déterminer le signal dS_{final} après stabilisation, puis on calcule la valeur de $dS = dS_{initial}-dS_{final}$, utilisée pour la comparaison

Selon un autre mode de réalisation, la comparaison peut être effectuée à une concentration légèrement inférieure à la concentration minimale entraînant la saturation de l'activité enzymatique de l'enzyme lors de la série de mesures de référence (cette concentration est, par exemple, située un peu avant le virage présenté sur les **Fig.1** et **2**), ce qui permet de mettre en évidence des pourcentages d'inhibition plus importants.

Selon un premier mode avantageux, l'on mesure l'inhibition des enzymes phosphatases alcalines, puis l'on corrèle le pourcentage d'inhibition obtenu à la concentration d'inhibiteurs contenus dans le liquide aqueux contrôlé, et en particulier à la concentration d'ions de métaux lourds. En particulier, l'inhibition des enzymes phosphatases alcalines est mesurée en utilisant la *para*-nitrophényl-phosphate comme substrat.

Selon un second mode avantageux, l'on mesure l'inhibition des enzymes acétylcholinestérases, puis l'on corrèle le pourcentage d'inhibition obtenu à la concentration d'inhibiteurs contenus dans le liquide aqueux contrôlé, et en particulier à la concentration de dérivés organophosphorés. En particulier, l'inhibition des enzymes acétylcholinestérases est mesurée en utilisant le chlorure d'acétylcholine comme substrat.

Selon un troisième mode avantageux, on meure, de façon indépendante, l'inhibition des enzymes phosphatases alcalines, et l'inhibition des enzymes acétylcholinestérases, comme mentionné ci-dessus.

Les séries de mesures de référence sont, dans ce cas, réalisées successivement et les mesures après contact utilisent la mise en contact préalable ci-dessus définie.

Le procédé de détection selon l'invention permet de détecter la présence de très faibles concentrations de polluants dans un liquide aqueux, et en particulier la présence d'ions de métaux lourds et/ou de dérivés organophosphorés à une concentration de l'ordre du ppb ou inférieure.

En effet, les biocapteurs selon l'invention sont multi-enzymatiques du fait de la présence naturelle de différentes enzymes membranaires dans les algues unicellulaires. Ces enzymes membranaires sont accessibles par les polluants contenus dans le liquide aqueux à contrôler. La mesure de l'activité enzymatique de ces différentes enzymes avant et après contact du biocapteur avec le liquide aqueux à analyser permet de déduire l'inhibition de certaines activités enzymatiques et donc la présence d'inhibiteurs spécifiques dans le liquide aqueux contrôlé. De plus, le pourcentage d'inhibition observé peut être directement relié à la concentration d'inhibiteurs, qualifiés de polluants.

Par ailleurs, ces biocapteurs sont peu chers, se présentent sous une forme miniature facilement transportable et manipulable et peuvent être utilisés directement sur le terrain pour effectuer des mesures rapides, étant donné que leur temps de réponse est de quelques minutes. De plus, contrairement aux bactéries, par exemple, les algues unicellulaires sont peu sensibles à la contamination bactérienne et, contrairement aux enzymes isolées, elles n'ont pas besoin d'être conservées à froid. Par conséquent, du fait de cette grande stabilité, les biocapteurs de l'invention peuvent être conservés pendant au moins une vingtaine de jours sans conditions particulières, notamment dans le cas de *chlorella vulgaris*. Le temps de conservation des biocapteurs est bien entendu lié à la durée de vie des cellules algales immobilisées et à la stabilité de la réponse enzymatique.

Les biocapteurs selon l'invention pourront être utilisés dans de nombreux domaines liés à l'environnement où il est important de contrôler en continu des milieux aqueux. Ces biocapteurs pourront notamment être utilisés pour la

surveillance d'effluents industriels et la détection de polluants en vu de déclencher des systèmes d'alarme et ainsi contribuer à la préservation des milieux aquatiques.

Les exemples ci-après illustrent l'invention sans toutefois la limiter.

EXEMPLES

Préparation des membranes et des capteurs

On utilise des souches algales *Chlorella Vulgaris* achetées à la collection de culture d'Algues et de Protozoaires Cumbria, Grande-Bretagne.

Pour posséder un niveau d'activité phosphatase alcaline satisfaisant, les algues doivent être soumises à une période de carence en phosphore. Pour cela, les cultures ensemencées en milieu AFNOR T90-304 et placées à buller (150 litres d'air/heure) en chambre de culture permettent d'obtenir des algues dans leur phase de croissance exponentielle (environ 4 jours après le repiquage). Ces algues sont alors transférées dans un milieu AFNOR T90-304 sans phosphate par centrifugation (4000 tours/minutes pendant 10 minutes) puis remises en suspension à une concentration de $3,75.10^5$ algues/ml. L'activité maximale est alors obtenue pour une période de starvation de 21 jours en chambre de culture et en bullage. A la fin de cette durée, on peut conserver les algues, pendant un mois, à 4° C et à l'obscurité sans atténuation notable de leur activité phosphatase alcaline.

Deux mélanges sont préparés à partir de 10 mg de BSA pour 100 µl d'algues : un contient des cellules algales vivantes et du BSA, l'autre des cellules algales mortes (passage à 100 °C pendant 15 minutes environ) dépourvues d'activité phosphatase et du BSA dans les mêmes proportions (mélange déposé sur l'électrode de référence).

Chaque mélange est déposé sur une des deux électrodes de détection à l'extrémité d'un capteur conductimétrique. Enfin, on place les capteurs au contact de vapeurs de glutaraldéhyde pendant 20 minutes.

Exemple 1 : mesure de l'activité phosphatase alcaline

composition	volume dans 5ml
tampon TRIS-HCl (1M, pH 8,5)	50 µl
$MgCl_2$ (0,01M)	500 µl
substrat	10 à 100 µl
eau distillée	qsp 5ml

Le tampon, le $MgCl_2$ et l'eau sont mélangés préalablement. Le biocapteur est plongé dans ce milieu réactionnel jusqu'à stabilisation du signal, puis un volume de substrat est injecté pour chaque mesure. Après stabilisation du signal réponse, l'amplitude de la variation dS (µS) avant/après injection est calculée. La courbe représentant dS en fonction de la concentration en substrat, appelée cinétique enzymatique, peut alors être tracée et permet de déduire la concentration de substrat entraînant la saturation de l'activité enzymatique de l'enzyme. Deux substrats ont été utilisés : la méthyl-umbelliféryl-phosphate (MUP) et la *para*-nitrophényl-phosphate (pNPP). La cinétique enzymatique de la phosphatase alcaline obtenue avec pNPP est présentée **Fig. 1.**

Ensuite, on mesure, avant contact avec la solution aqueuse polluée, l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline, en injectant un volume de substrat correspondant à la saturation de l'enzyme, puis on met le capteur au contact avec la solution aqueuse polluée pendant un temps **t**. On renouvelle ensuite la mesure d'activité enzymatique en injectant un même volume de substrat correspondant à la saturation de l'enzyme et on calcule l'inhibition observée par rapport à celle avant contact.

De telles mesures de l'inhibition de l'activité de la phosphatase alcaline ont été réalisées sur des solutions aqueuses contenant des ions cadmium Cd^{2+} à des concentrations comprises entre 0,1 ppb et 10 ppm.

Le volume de pNPP injecté est de 100 µl, correspondant à 0,86 mM, le temps de contact entre les algues et les ions Cd^{2+} est de 45 minutes.

Le TABLEAU ci-après indique les taux d'inhibition obtenus pour des concentrations de Cd^{2+} de 1,10 et 100 ppb.

Concentration en Cd^{2+}	**Taux d'inhibition de la phosphatase alcaline**
1 ppb	10%
10 ppb	40%
100 ppb	100%

Exemple 2 : mesure de l'activité acétylcholinestérase

composition	**volume dans 5ml**
tampon KH_2PO_4 (5mM, pH 8)	2500 µl
Substrat	10 à 100 µl
eau distillée	qsp 5 ml

Le principe de la mesure est le même que celui décrit à l'exemple 1 pour la phosphatase alcaline. Le substrat utilisé est le chlorure d'acétylcholine (AChCl). La cinétique enzymatique de l'acétylcholinestérase obtenue avec AChCl est présentée **Fig. 2.**

Des mesures de l'inhibition de l'activité de l'acétylcholinestérase ont été réalisées sur des solutions aqueuses contenant du paraoxon-méthyl à des concentrations de 50 et 100 ppb.

Le volume d'AChCl injecté est de 100 µl, correspondant à 10mM et le temps de contact entre les algues et le paraoxon-méthyl de 15 minutes.

Pour une concentration en paraoxon-méthyl de 100 ppb, on obtient un taux d'inhibition de l'acéthylcholinestérase de 100 %.

Exemple 3 : mesure de l'activité phosphatase alcaline puis de l'activité acétylcholinestérase

On mesure successivement l'inhibition de l'activité de la phosphatase alcaline puis de l'acétylcholinestérase, conformément aux exemples 1 et 2 respectivement, observée en plongeant le biocapteur dans une solution aqueuse contenant 25 ppb d'ions cadmium Cd^{2+} et 50 ppb de paraoxon .

Les volumes de substrat injectés sont de 100 µl soit 0,86 mM pour le pNPP et 100 µl soit 10 mM pour l'AChCl. Le temps de contact entre les algues et le mélange Cd^{2+}/paraoxonméthyl est de 30 minutes. On obtient un taux d'inhibition de l'acétylcholinestérase de 100 % et un taux d'inhibition de la phosphatase alcaline de 80 %.

REVENDICATIONS

1 - Biocapteur muti-enzymatique, destiné à détecter la présence éventuelle de polluants spécifiques au sein d'un liquide aqueux, comportant un capteur conductimétrique ou potentiométrique avec une électrode de référence et une électrode de mesure sur laquelle des algues unicellulaires vivantes sont immobilisées, ces algues comprenant différentes enzymes membranaires réactives, les polluants détectables ayant le pouvoir d'inhiber l'activité enzymatique de l'une des enzymes membranaires.

2 - Biocapteur selon la revendication 1, caractérisé en ce que les algues unicellulaires sont des algues *Chlorella Vulgaris*.

3 - Biocapteur selon la revendication 2, caractérisé en ce que, avant immobilisation, les algues *Chlorella Vulgaris* sont maintenues en milieu carencé en phosphate pendant une durée minimum de 15 jours.

4 - Biocapteur selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que les cellules algales sont immobilisées à raison de 1.10^3 à 10.10^3 algues/mm^2 de surface d'électrode, de préférence de 1.10^3 à 3.10^3 algues/mm^2 de surface d'électrode.

5 - Biocapteur selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que les algues unicellulaires sont immobilisées avec de l'albumine de sérum bovin polymérisée et du glutaraldéhyde comme agent réticulant.

6 - Procédé pour détecter la présence éventuelle de polluants au sein d'un liquide aqueux à contrôler, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes successives suivantes :

a) mettre un biocapteur selon l'une des revendications 1 à 5 en contact avec le liquide aqueux à contrôler, puis

b) mesurer l'éventuelle inhibition de l'activité enzymatique d'une première enzyme membranaire des algues unicellulaires pour en déduire la présence, dans le liquide aqueux contrôlé, de polluants spécifiques responsables de l'inhibition détectée,

c) répéter l'étape b) pour une deuxième enzyme membranaire.

7 - Procédé de détection selon la revendication 6 caractérisé en ce que, antérieurement à l'étape a), on effectue une série de mesures de référence lors de

laquelle on détecte le signal électrique émis par le biocapteur lorsque celui-ci est mis en contact avec une concentration variable de substrat approprié de l'enzyme membranaire réactive dont on veut mesurer l'activité, pour en déduire notamment une concentration de substrat entraînant la saturation de l'activité enzymatique de l'enzyme,

et en ce que à l'étape b), on mesure l'éventuelle inhibition de l'activité enzymatique de cette enzyme, en comparant le signal électrique obtenu, avant contact et après contact du biocapteur avec le liquide aqueux contrôlé, à une même concentration, correspondant la saturation de l'activité enzymatique de l'enzyme lors de la série de mesures de référence.

8 - Procédé de détection selon la revendication 6 caractérisé en ce que, antérieurement à l'étape a), on effectue une série de mesures de référence lors de laquelle on détecte le signal électrique émis par le biocapteur lorsque celui-ci est mis en contact avec une concentration variable de substrat approprié de l'enzyme membranaire réactive dont on veut mesurer l'activité, pour en déduire notamment une concentration de substrat entraînant la saturation de l'activité enzymatique de l'enzyme,

et en ce que à l'étape b), on mesure l'éventuelle inhibition de l'activité enzymatique de cette enzyme, en comparant le signal électrique obtenu, avant contact et après contact du biocapteur avec le liquide aqueux contrôlé, à une même concentration, correspondant à une concentration légèrement inférieure à la concentration minimale entraînant la saturation de l'activité enzymatique de l'enzyme lors de la série de mesures de référence.

9 - Procédé de détection selon l'une des revendications 6 à 8 caractérisé en ce que l'on mesure l'inhibition des enzymes phosphatases alcalines, puis l'on corrèle le pourcentage d'inhibition obtenu à la concentration d'inhibiteurs contenus dans le liquide aqueux contrôlé, et en particulier à la concentration d'ions de métaux lourds.

10 - Procédé de détection selon la revendication 9 caractérisé en ce que l'inhibition des enzymes phosphatases alcalines est mesurée en utilisant la *para*-nitrophényl-phosphate comme substrat.

11 - Procédé de détection selon l'une des revendications 6 à 8 caractérisé en ce que l'on mesure l'inhibition des enzymes acétylcholinestérases, puis l'on corrèle le

pourcentage d'inhibition obtenu à la concentration d'inhibiteurs contenus dans le liquide aqueux contrôlé, et en particulier à la concentration de dérivés organophosphorés.

12 - Procédé de détection selon la revendication 11 caractérisé en ce que l'inhibition des enzymes acétylcholinestérases est mesurée en utilisant le chlorure d'acétylcholine comme substrat

13 - Procédé de détection selon l'une des revendications 6 à 12 caractérisé en ce que, de façon indépendante, l'on mesure l'inhibition des enzymes phosphatases alcalines, puis l'on corrèle le pourcentage d'inhibition obtenu à la concentration d'inhibiteurs contenus dans le liquide aqueux contrôlé, et en particulier à la concentration d'ions de métaux lourds, et l'on mesure l'inhibition des enzymes acétylcholinestérases, puis l'on corrèle le pourcentage d'inhibition obtenu à la concentration d'inhibiteurs contenus dans le liquide aqueux contrôlé, et en particulier à la concentration de dérivés organophosphorés.

14 - Procédé de détection selon l'une des revendications précédentes pour détecter la présence d'ions de métaux lourds et/ou de dérivés organophosphorés à une concentration de l'ordre du ppb ou inférieure dans un liquide aqueux.

FIG.1

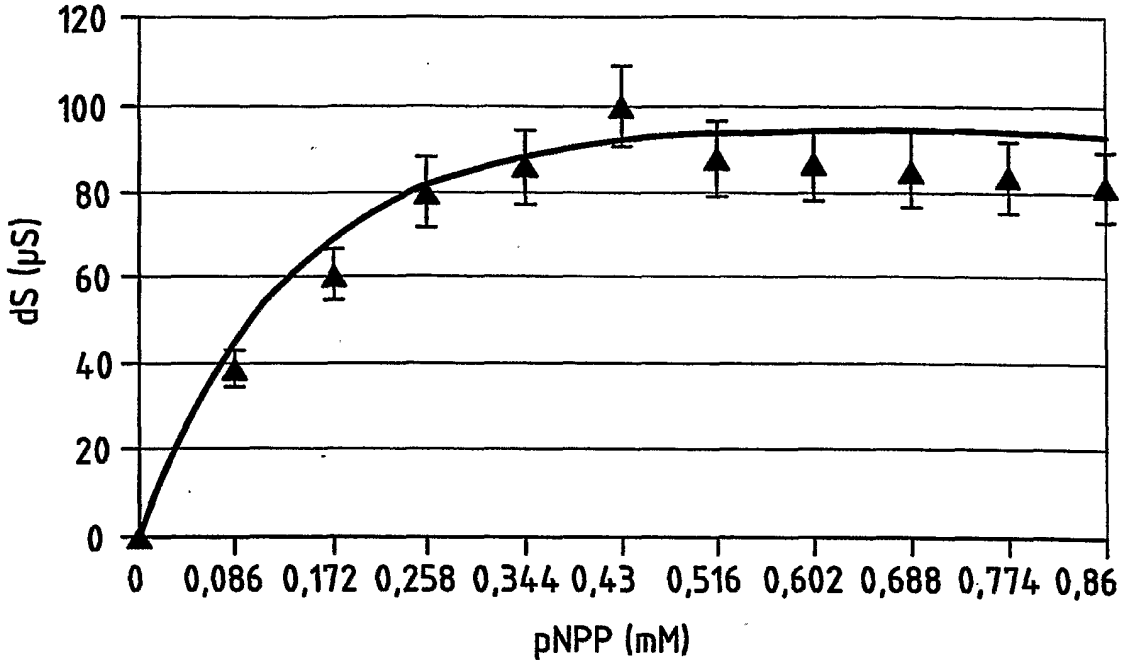
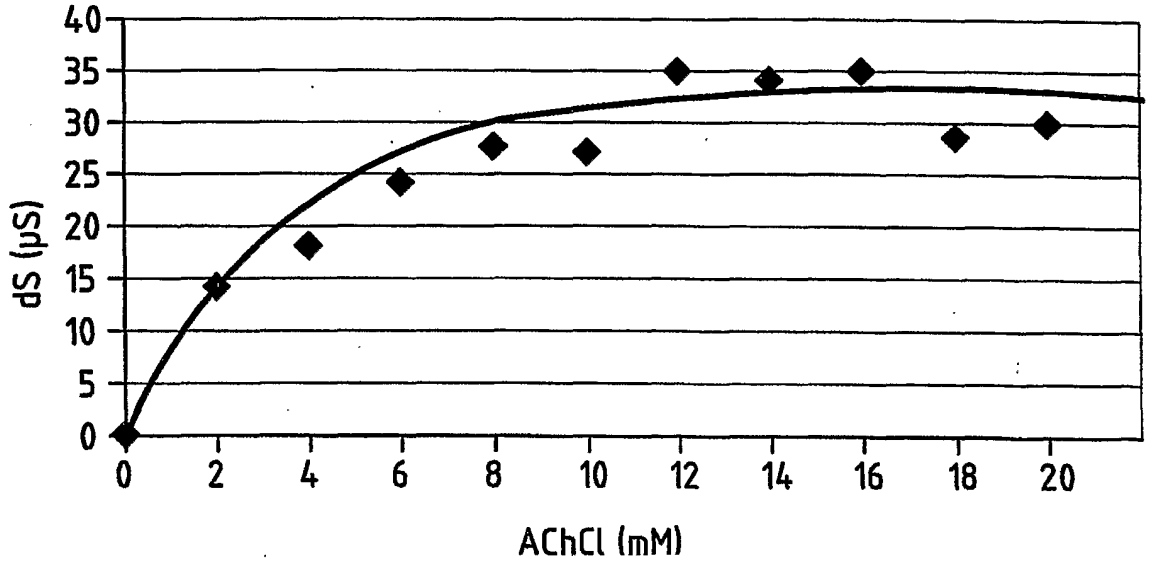

120
100
80
60
40
20
0
dS (µS)
0
0,086
0,172
0,258
0,344
0,43
0,516
0,602
0,688
0,774
0,86
pNPP (mM)

FIG.2


40
35
30
25
20
15
10
5
0
dS (µS)
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
AChCl (mM)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 03/03178

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12Q1/00 G01N33/543 G01N33/487

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12Q G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	PANDARD P ET AL: "COMPARISON OF TWO TYPES OF SENSORS USING EUKARYOTIC ALGAE TO MONITOR POLLUTION OF AQUATIC SYSTEMS" WATER RESEARCH, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 27, no. 3, 1 March 1993 (1993-03-01), pages 427-431, XP000345141 ISSN: 0043-1354 the whole document --- -/--	1-14

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[ ] Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
3 March 2004	26/03/2004

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31–70) 340–2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31–70) 340–3016	Jacques, P

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 03/03178

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DANZER THOMAS ET AL: "Chemometric methods for the development of a biosensor system and the evaluation of inhibition studies with solutions and mixtures of pesticides and heavy metals Part 1. Development of an enzyme electrodes system for pesticide and heavy metal screening using selected chemometric methods" ANALYTICA CHIMICA ACTA, vol. 318, no. 3, 1996, pages 275-286, XP002272150 ISSN: 0003-2670 p.276, last paragraph; p.277, section 2.4 abstract ---	1-14
Y	PANDEY P C ET AL: "Acetylthiocholine/acetylcholine and thiocholine/choline electrochemical biosensors/sensors based on an organically modified sol-gel glass enzyme reactor and graphite paste electrode" SENSORS AND ACTUATORS B, ELSEVIER SEQUOIA S.A., LAUSANNE, CH, vol. 62, no. 2, February 2000 (2000-02), pages 109-116, XP004189245 ISSN: 0925-4005 abstract ---	11,12
Y	LIU B ET AL: "Characterization of immobilization of an enzyme in a modified Y zeolite matrix and its application to an amperometric glucose biosensor" ANALYTICAL CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. COLUMBUS, US, vol. 69, no. 13, 1 July 1997 (1997-07-01), pages 2343-2348, XP002250456 ISSN: 0003-2700 p.2343, colonne de gauche, l.10-11 ---	5
A	DURRIEU C ET AL: "Optical algal biosensor using alkaline phosphatase for determination of heavy metals" ECOTOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL SAFETY, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, CA, US, vol. 51, no. 3, March 2002 (2002-03), pages 206-209, XP002250457 ISSN: 0147-6513 the whole document --- -/--	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 03/03178

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication,where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CAMPANELLA L ET AL: "An algal biosensor for the monitoring of water toxicity in estuarine environments" WATER RESEARCH, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 35, no. 1, January 2001 (2001-01), pages 69-76, XP004236286 ISSN: 0043-1354 the whole document ---	1-14
A	BOUSSE L: "Whole cell biosensors" SENSORS AND ACTUATORS B, ELSEVIER SEQUOIA S.A., LAUSANNE, CH, vol. 34, no. 1, 1 August 1996 (1996-08-01), pages 270-275, XP004031726 ISSN: 0925-4005 the whole document -----	1-14

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR 03/03178

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 C12Q1/00 G01N33/543 G01N33/487

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 7 C12Q G01N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)
EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	PANDARD P ET AL: "COMPARISON OF TWO TYPES OF SENSORS USING EUKARYOTIC ALGAE TO MONITOR POLLUTION OF AQUATIC SYSTEMS" WATER RESEARCH, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 27, no. 3, 1 mars 1993 (1993-03-01), pages 427-431, XP000345141 ISSN: 0043-1354 le document en entier --- -/--	1-14

[X] Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

[ ] Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée
"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
"X" document particulièrement pertinent; l'inven tion revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
"Y" document particulièrement pertinent; l'inven tion revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
3 mars 2004	26/03/2004

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale	Fonctionnaire autorisé
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31–70) 340–2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31–70) 340–3016	Jacques, P

Formulaire PCT/ISA/210 (deuxième feuille) (juillet 1992)

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec,le cas échéant, l'indicationdes passages pertinents	no. des revendications visées
Y	DANZER THOMAS ET AL: "Chemometric methods for the development of a biosensor system and the evaluation of inhibition studies with solutions and mixtures of pesticides and heavy metals Part 1. Development of an enzyme electrodes system for pesticide and heavy metal screening using selected chemometric methods" ANALYTICA CHIMICA ACTA, vol. 318, no. 3, 1996, pages 275-286, XP002272150 ISSN: 0003-2670 p.276, last paragraph; p.277, section 2.4 abrégé	1-14
Y	PANDEY P C ET AL: "Acetylthiocholine/acetylcholine and thiocholine/choline electrochemical biosensors/sensors based on an organically modified sol-gel glass enzyme reactor and graphite paste electrode" SENSORS AND ACTUATORS B, ELSEVIER SEQUOIA S.A., LAUSANNE, CH, vol. 62, no. 2, février 2000 (2000-02), pages 109-116, XP004189245 ISSN: 0925-4005 abrégé	11,12
Y	LIU B ET AL: "Characterization of immobilization of an enzyme in a modified Y zeolite matrix and its application to an amperometric glucose biosensor" ANALYTICAL CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. COLUMBUS, US, vol. 69, no. 13, 1 juillet 1997 (1997-07-01), pages 2343-2348, XP002250456 ISSN: 0003-2700 p.2343, colonne de gauche, l.10-11	5
A	DURRIEU C ET AL: "Optical algal biosensor using alkaline phosphatase for determination of heavy metals" ECOTOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL SAFETY, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, CA, US, vol. 51, no. 3, mars 2002 (2002-03), pages 206-209, XP002250457 ISSN: 0147-6513 le document en entier	1-14

-/--

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec,le cas échéant, l'indicationdes passages pertinents	no. des revendications visées
A	CAMPANELLA L ET AL: "An algal biosensor for the monitoring of water toxicity in estuarine environments" WATER RESEARCH, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 35, no. 1, janvier 2001 (2001-01), pages 69-76, XP004236286 ISSN: 0043-1354 le document en entier	1-14
A	BOUSSE L: "Whole cell biosensors" SENSORS AND ACTUATORS B, ELSEVIER SEQUOIA S.A., LAUSANNE, CH, vol. 34, no. 1, 1 août 1996 (1996-08-01), pages 270-275, XP004031726 ISSN: 0925-4005 le document en entier	1-14