

THÈSE

**Université Via
Domitia
Perpignan - France**

Présentée pour obtenir le grade de
DOCTEUR

**Université Ibn Zohr
Faculté des Sciences
Agadir - Maroc**

de l'Université Ibn Zohr d'Agadir

et

de l'Université Via Domitia de Perpignan

Spécialité: **Biochimie**

Par : **Najwa BEN OUJJI**



Développement de biocapteurs enzymatiques associés à des polymères à empreinte moléculaire (MIPs) pour la détection selective et sensible des organophosphorés utilisés en oléiculture.

Soutenue publiquement le 17 Décembre 2012

Devant la commission d'examen composée de :

Président :

Abderrazak KAAYA : Professeur, Faculté des sciences Agadir (Maroc)

Rapporteurs :

Saad Alami YOUNSSI : Professeur, Faculté des sciences et techniques Mohammedia (Maroc)
Mohammed BOUJTITA : Maître de Conférences HDR, Faculté des sciences et techniques de Nantes (France)

Examinateur

Régis ROUILLOON : Professeur, Université de Perpignan Via Domitia (France)

Encadrants :

Thierry NOGUER : Professeur, Université de perpignan Via Domitia (France)
Ihya AIT ICHOU : Doyen, Professeur, Faculté des sciences Agadir (Maroc)
El habib AIT ADDI : Professeur habilité, Faculté des sciences Agadir (Maroc)

Invité :

Georges Istamboulie : Ingénieur, Université de Perpignan Via Domitia (France)



REMERCIEMENTS

Le travail qui est résumé dans le présent manuscrit a été effectué au sein du laboratoire IMAGES de l'université de perpignan Via Domitia en France et le laboratoire AQUAMAR de la faculté des sciences Ibn Zohr d'Agadir au MAROC et a bénéficié du soutien financier du programme européen AVERROES.

Avant d'entamer la présentation du travail réalisé, Je tiens tout d'abord à exprimer ma profonde gratitude et ma sincère reconnaissance aux personnes qui m'ont encadré durant ces longues années de thèse :

Monsieur Thierry Noguer, Directeur de thèse en France, professeur à l'Université Via Domitia de Perpignan et directeur du laboratoire IMAGES, qui a initié cette thèse et m'a guidé et conseillé au quotidien. Je vous remercie d'avoir apporté vos connaissances et d'avoir passé de nombreux moments à la correction de ce manuscrit et des publications.

Monsieur Ihya Ait Ichou, directeur de thèse au Maroc, professeur et doyen de la faculté des sciences de l'Université Ibn Zohr d'Agadir, qui m'a aidé tout au long de cette étude, avec ses conseils et ses encouragements. Je tiens à lui manifester toute ma gratitude pour m'avoir donné l'opportunité de continuer ma formation.

Monsieur Régis Rouillon, co-directeur de thèse en France, professeur à l'Université de Perpignan et directeur du département Génie Biologique de l'IUT pour la confiance qu'il m'a apporté tout au long de ce travail, pour sa disponibilité, son soutien et son aide inestimable, ainsi que pour ses qualités humaines.

Monsieur Elhabib Ait addi, co-directeur de thèse au Maroc, professeur à la faculté des sciences de l'Université Ibn Zohr d'Agadir, pour son soutien, son expérience et ses conseils judicieux qui ont été d'une grande aide pour l'aboutissement de ces travaux.

Merci pour tout ce que vous m'avez appris et donné durant ces 4 années de thèse.

*Un grand remerciement est dédié à monsieur **Georges Istamboulie**, chercheur post-doctorat au laboratoire IMAGES qui m'a guidé dans mes premiers pas de recherche. Ses compétences scientifiques, son dévouement total pour la recherche, ses qualités humaines, ses précieux conseils ont été pour moi une source de réconfort et d'encouragement dans la réalisation de ce travail. Qu'il trouve dans ce manuscrit la modeste expression de ma reconnaissance et de mon éternelle gratitude.*

*Je tiens également à remercier Monsieur **Ali Assabbane**, professeur à la faculté des sciences de l'Université Ibn Zohr d'Agadir, pour son aide très précieuse, son soutien et son encouragement.*

*Je remercie vivement Monsieur **Abderrazak Kaaya**, professeur à la Faculté des sciences d'Agadir qui a bien voulu présider le jury de cette thèse, Je le prie d'accepter l'expression de mon respect et de ma profonde considération.*

*Je remercie tout aussi sincèrement Mr **Saad Alami Younssi**, professeur à la Faculté des sciences et technique du Mohammedia au Maroc et Mr **Mohammed Boujtita** professeur à la Faculté des sciences et techniques de Nantes en France qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'être rapporteurs de mon travail. Je les prie d'accepter l'expression de mon respect, de ma profonde considération et de mes vifs remerciements.*

*Je n'oublierai pas de remercier tous les membres du Centre des études doctorales (CED), tout particulièrement, madame la directrice **Lalla Mina Idrissi Hassani**, professeur à la Faculté des sciences d'Agadir et Mr **Omar Hassnaoui** Administrateur au CEDoc Ibn Zohr, ainsi que tout les membres de la **DRED** tout particulièrement, Mrs **Solange Pinol** et Mrs **Jocelyne Pla**, pour leur soutient, leur support ainsi que pour les facilités offertes pour la réalisation de cette thèse.*

Merci également à tous les doctorants et ex-doctorants des deux laboratoires avec qui j'ai partagé de beaux moments.

Enfin, j'aimerais remercier l'ensemble des membres de notre laboratoire qui m'ont aidée et encouragée durant l'accomplissement de cette thèse. Merci à vous tous.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

الى امي الغالية ابوا المغارفه حبيبه

A ma mère : BOULMGHAREF HABIBA

A celle qui a attendu avec patience les fruits de sa bonne éducation, aucune dédicace ne saurait exprimer mon immense amour, mon estime, ma profonde affection et ma reconnaissance pour tous les sacrifices consentis pour mon bonheur et ma réussite. Merci pour m'avoir toujours supportée dans mes décisions. Merci pour tout votre amour, votre soutien et votre confiance. Que Dieu tous puissant te protège et t'accorde longue vie et nous garde toujours réunis pour le bonheur et la prospérité.

A mon frère Hamza qui m'a soutenue tout au long de ces années d'études, merci pour ton amour fraternel, ton soutien et ton encouragement.

A la mémoire de ma grande mère et à tous les membres de ma famille, pour leur affection, leur amour, et leurs prières.

A tous mes amis et à tous ceux qui me sont chers...

Je vous aime tous

Résumé

Ce travail a pour objet le développement d'outils enzymatiques sensibles et sélectifs pour la détection de trois pesticides organophosphorés utilisés pour le traitement des oliviers : le malathion, le diméthoate et le méthidathion, sous leurs formes oxydées. Les systèmes développés sont des bioessais à détection optique ou des biocapteurs à détection ampérométrique.

Dans cette étude l'enzyme utilisée comme biorécepteur a été l'acétylcholinestérase d'anguille électrique. Trois méthodes d'immobilisation ont été mises en œuvre : l'immobilisation par adsorption, l'immobilisation par liaisons covalentes sur des billes magnétiques et le piégeage dans une matrice sol-gel. En fonction du type de support mis en œuvre (microplaques ou électrodes sérigraphiées), 5 outils différents ont pu être développés, à savoir deux bioessais à détection optique et 3 biocapteurs ampérométriques. Les systèmes mis au point ont été optimisés avec des échantillons de laboratoire puis testés sur des échantillons naturels d'huile d'olive après une simple extraction liquide-liquide.

Parmi ces 5 systèmes conçus, le biocapteur ampérométrique basé sur l'immobilisation de l'acétylcholinestérase dans une matrice sol-gel a permis d'obtenir les meilleures performances en termes de stabilité opérationnelle, stabilité au stockage, reproductibilité. Il s'est avéré de plus être le mieux adapté au dosage d'échantillons réels d'huile d'olive. Ce biocapteur a été associé à une méthode d'extraction basée sur l'utilisation de polymères à empreintes moléculaire (MIPs), permettant l'extraction très sélective d'un pesticide cible d'un mélange de composés différents.

Des polymères à empreintes moléculaires spécialement conçus pour les trois pesticides mis en jeu ont été développés en parallèle de cette thèse. Les résultats obtenus ont montré que

l'association MIPs-biocapteur permet de détecter et de quantifier sélectivement les trois insecticides organophosphorés dans une matrice complexe telle que l'huile d'olive.

Mots-clés : biocapteur, bioessais, huile d'olive, organophosphorés, acétylcholinestérase d'anguille électrique.

Abstract

The aim of this work was the development of sensitive and selective enzymatic tools for the detection of three organophosphate pesticides mainly used for the treatment of olive trees: malathion, dimethoate and methidathion, in their oxidized forms. The developed systems are bioassays based on optical detection or biosensors based on amperometric measurements.

In this study the enzyme used as bioreceptor was the acetylcholinesterase from electric eel. Three immobilization methods have been tested: immobilization by adsorption, covalent immobilization on magnetic beads and immobilisation by entrapment in a sol-gel matrix. Depending on the support used (microplates or screen printed electrodes), 5 different tools have been developed: two optical bioassays and 3 amperometric biosensors. These developed systems were optimized with laboratory samples and then tested on natural samples of olive oil after a simple liquid-liquid extraction.

Among these five systems designed, the amperometric biosensor based on acetylcholinesterase immobilized by bioencapsulation in a sol-gel matrix presented the best performance in terms of operational stability, storage stability, reproducibility, and it proved to be best suited for the determination of real samples of olive oil. This biosensor has been associated with a highly selective extraction method based on the use of molecular imprinted polymers (MIPs), allowing the extraction of a target pesticide from a mixture of different compounds. The molecular imprinted polymers used in this study were specially designed for the three targets pesticides.

The results showed that the association MIPs-biosensor can selectively detect and quantify the three organophosphorus insecticides in a complex matrix such as olive oil.

Keywords: Biosensor, bioassay, olive oil, organophosphate, electric eel acetylcholinesterase.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	7
LISTE DES ABREVIATION.....	10
LISTE DES FIGURES.....	12
LISTE DES TABLEAUX	16
AVANT-PROPOS.....	18
INRODUCTION GENERALE.....	22
I. ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	26
I.1. Biocapteur.....	26
I.1.1 Le biorécepteur : acétylcholinestérase.....	28
I.1.1.1. Rôle physiologique et structure.....	28
I.1.1.2. Mécanisme d'inhibition.....	32
I.1.2 Transducteur.....	33
I.1.2.1 Les biocapteurs électrochimiques.....	34
I.1.2.2 Les capteurs optiques.....	35
I.1.3 Méthodes d'immobilisation.....	36
I.2. Les pesticides.....	39
I.2.1 Les organophosphorés.....	43
I.3. L'huile d'olive.....	45
I.3.1 Le secteur oléicole au Maroc	47
I.3.2 Le secteur oléicole en France.....	48
I.4. Les polymères à empreinte moléculaire (MIPs).....	48
II. MATERIELS ET METHODES.....	52
II.1. Réactifs utilisés.....	52
II.2. Matériels.....	54
II.3. Méthodes.....	55
II.3.1. Étude spectrophotométrique de l'activité enzymatique.....	55
II.3.1.1 Détermination de l'activité enzymatique	55
II.3.1.2 Détermination des paramètres cinétiques de l'enzyme.....	58
II.3.1.3. Détermination des constantes d'inhibition de l'acétylcholinestérase.....	60

II.3.2. Méthodes d'immobilisation de l'acétylcholinestérase.....	61
II.3.2.1. Immobilisation dans une matrice sol gel.....	63
II.3.2.2. Immobilisation par liaisons covalentes sur des billes magnétiques.....	66
II.3.2.3. Immobilisation par adsorption.....	68
II.3.3. Méthodes de détection.....	70
II.3.3.1 Méthode ampérométrique.....	70
a. Fabrication des électrodes sérigraphiées	70
b. Détection ampérométrique des insecticides organophosphorés.....	72
II.3.3.2. Détection optique.....	74
II.3.4. Oxydation des pesticides.....	75
II.3.5. Application sur les échantillons naturels.....	77
II.3.5.1. Extraction liquide-liquide.....	77
II.3.5.2. Extraction par polymères à empreinte moléculaire.....	78
III. RESULTATS ET DISCUSSION.....	80
III.1. Caractérisation de l'acetylcholinesterase mis en jeu.....	81
III.1.1. Détermination des paramètres cinétiques.....	82
III.1.2. Etude de la stabilité de l'enzyme.....	83
III.1.3. Constantes d'inhibition.....	84
III.2. Détection des insecticides organophosphorés par biocapteur ampérométrique.....	86
III.2.1. Oxydation du méthidathion.....	86
III.2.2. Effet de l'acétonitrile	89
III.2.3. Méthodes d'immobilisation.....	89
A. Immobilisation par adsorption.....	90
1. Optimisation du temps de réaction.....	90
2. Caractéristiques du capteur.....	90
3. Détection des organophosphorés.....	91
4. Application sur les échantillons naturels.....	92
5. Conclusion	94
B. Immobilisation par liaisons covalentes sur des billes magnétiques.....	95
1. Détection colorimétrique.....	96
a. Optimisation du temps de réaction.....	96
b. Détection des organophosphorés par la méthode colorimétrique	97
c. Application sur des échantillons naturels.....	99

2. Détection ampérométrique.....	100
a. Détermination du temps d'incubation.....	100
b. Caractéristiques des biocapteurs.....	101
c. Détection des organophosphorés.....	102
d. Application sur les échantillons naturels d'huile d'olive.....	103
e. Conclusion	105
C. Immobilisation par bioencapsulation dans une matrice sol-gel	106
1. Détection optique.....	107
a. Détermination de temps d'incubation.....	107
b. Caractéristiques des dispositifs analytiques.....	107
c. Détection des organophosphorés.....	108
d. Application sur les échantillons naturels d'huile d'olive.....	109
2. Détection ampérométrique.....	110
a. Caractéristiques des biocapteurs.....	110
b. Détection des organophosphorés.....	111
c. Application sur les échantillons naturels d'huile d'olive.....	112
d. Conclusion.....	113
III.3. Comparaison entre les différents capteurs développés.....	115
III.4. Association Biocapteur-MIPs.....	116
CONCLUSION GÉNÉRALE.....	121
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	125
ANNEXES.....	133

LISTE DES ABREVIATIONS

AChE : Acétylcholinestérase

AChE-ee : Acétylcholinestérase d'anguille électrique.

ADN : Acide désoxyribonucléique

AIBN : Azo- *-N,N'* bis(isobutyronitrile)

ARN : Acide ribonucléique

ATCh-I : Acétylthiocoline iodide

CEN : Comité européen de normalisation

COI : Conseil Oléicole International

Co-Pc : Cobalt phtalocyanine

DL : Dose létale

DL50 : Nombre de milligramme de matières actives par kilogramme de masse corporelle, nécessaire pour tuer 50% d'un échantillon test d'animaux.

DPV : Direction de la production végétale.

DTNB : Acide 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoïque)

ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay.

EPA : Environmental Protection Agency (Agence gouvernementale des États-Unis pour l'environnement)

HCl : Acide chlorhydrique

HEC : Hydroéthylcellulose

HPLC : Chromatographie en phase liquide à haute performance

IC : Concentration inhibitrice

Ki : Constante d'inhibition

K_m : Constante de Michaelis-Menten

LDL : « Low density lipoprotein »

LMRs : Limite maximal des résidus

MAMVA : Ministère de l'Agriculture, de l'Équipement et de l'Environnement

MIP(s) : Polymère(s) à empreintes moléculaires

NBS : *N*-bromosuccinimide

OMS : Organisation mondiale de la santé

OPs : Pesticides organophosphorés

PEG : Polyéthylène glycol

ppm : Partie par million

PVC : Polychlorure de vinyle

PVA-AWP : Poly (vinyl alcohol) azide-unit

R.S.D : Ecart-type relatif (relative standard deviation)

SPE : Electrode sérigraphiée (screen printed electrod)

TMOS : Tétraméthoxysilane

U.E : Union européenne

UI : Unités internationales

V_m : Vitesse maximale

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Représentation schématique d'un biocapteur (d'après C.T.Minh, 2001)

Figure 2 : Hydrolyse de l'acétylcholine par l'AChE au niveau de la synapse cholinergique.

Figure 3 : Représentation schématique de l'acétylcholinestérase (kryger et al., 1999)

Figure 4 : Les différentes méthodes d'immobilisation, E : enzyme ; P : protéine inerte.

Figure 5: Structure générale des organophosphorés.

Figure 6 : Structure des organophosphorés et de leurs formes oxydées utilisées dans cette étude : (a) diméthoate et ométhoate, (b) malathion et malaoxon, (c) méthidathion et méthidathion oxydé.

Figure 7 : Principe de formation d'une empreinte moléculaire

Figure 8: Représentation d'une cinétique enzymatique, $Vi = \Delta A / \Delta t$.

Figure 9 : Détection colorimétrique de la thiocholine par la méthode d'Ellman (1961)

Figure 10-a : Représentation de Michaelis-Menten.

Figure 10-b : Représentation de Lineweaver-Burk.

Figure 11: Structures générales des organophosphorés et carbamates (R_1 et R_2 substituants aliphatiques ou aromatiques).

Figure 12 : Méthode de détermination graphique du kobs (a) et du ki (b).

Figure 13 : Immobilisation de l'AChE par encapsulation dans une matrice sol-gel.

Figure 14: Protocole d'immobilisation par la méthode sol-gel, principe de mesure de l'inhibition par les pesticides.

Figure 15: Protocole d'immobilisation par liaison covalente sur des billes magnétiques, principe de mesure de l'inhibition par les pesticides.

Figure 16 : Protocole d'immobilisation par adsorption sur microplaqué et principe de mesure de l'inhibition par les pesticides.

Figure 17 : Machine à sérigraphier DEK 248 (à gauche) et étapes de fabrication des électrodes par sérigraphie (à droite).

Figure 18 : Représentation du montage utilisé pour les mesures ampérométriques

Figure 19 : Détection ampérométrique des insecticides organophosphorés A: mesure de la réponse initiale du capteur (3 à 5 essais successifs), B: mesure de la réponse après incubation dans une solution d'inhibiteur de concentration connue.

Figure 20: Principe de mesure colorimétrique des activités enzymatiques.

Figure 21 : Oxydation du méthidathion par le N-bromosuccinimide (NBS).

Figure 22 : Représentation de Michaelis-Menten.

Figure 23: Représentation de Lineweaver-Burk.

Figure 24 : Détermination de k_{obs} et k_i pour le méthidathion oxydé.

Figure 25 : Détermination de k_{obs} et k_i pour le malaoxon.

Figure 26 : Détermination de k_{obs} et k_i pour l'ométhoate.

Figure 27 : Chromatogrammes obtenus après oxydation du méthidathion (0,01 mM) par le N-bromosuccinimide à des concentrations de 0,01, 0,02, 0,03, 0,04 et 0,05 mM.

Figure 28 : Droites de calibration obtenues avec un capteur optique à AChE immobilisée par adsorption sur des microplaques.

Figure 29 : Essais de détection des 3 insecticides sur microplaques avec AChE absorbée : comparaison de l'inhibition obtenue avec des solutions standard (tampon) et après extraction de l'huile d'olive (échantillons naturels)

Figure 30 : Comparaison de la réponse des biocapteurs préparés avec des billes magnétiques activées (AChE + glutaraldéhyde) et des billes non activées (AChE seule).

Figure 31 : Droites de calibration obtenues avec un capteur optique à AChE immobilisée sur des billes magnétiques déposées sur des microplaques.

Figure 32 : Essais de détection des 3 insecticides sur microplaques avec AChE immobilisée sur des billes magnétiques : comparaison de l'inhibition obtenue avec des solutions standard (tampon) et après extraction de l'huile d'olive (échantillons naturels)

Figure 33 : Influence du temps d'incubation sur le pourcentage d'inhibition. Détection de l'ométhoate à $2,5 \cdot 10^{-5} M$, du méthidathion oxydé à $2,5 \cdot 10^{-7} M$ et du malaoxon à $10^{-6} M$.

Figure 34: Droites de calibration obtenues avec un capteur ampérométrique à AChE immobilisée sur des billes magnétiques.

Figure 35 : Essais de détection des 3 insecticides par biocapteur ampérométrique à AChE immobilisée sur des billes magnétiques : comparaison de l'inhibition obtenue avec des solutions standard (tampon) et après extraction de l'huile d'olive (échantillons naturels)

Figure 36: Stabilité au stockage des dispositifs préparés par immobilisation de l'acétylcholinestérase sur microplaques dans une matrice sol-gel.

Figure 37: Droites de calibration obtenues avec un capteur optique à AChE immobilisée dans une matrice sol-gel.

Figure 38: Essais de détection des 3 insecticides par un dispositif optique à AChE immobilisée dans une matrice sol-gel : comparaison de l'inhibition obtenue avec des solutions standard (tampon) et après extraction de l'huile d'olive (échantillons naturels)

Figure 39: Droites de calibration obtenues avec un capteur ampérométrique à AChE immobilisée par encapsulation dans une matrice sol-gel.

Figure 40 : Essais de détection des 3 insecticides par un biocapteur ampérométrique à AChE immobilisée dans une matrice sol-gel : comparaison de l'inhibition obtenue avec

des solutions standard (tampon) et après extraction de l'huile d'olive (échantillons naturels).

Figure 41 : *Essais de détection des 3 insecticides par un biocapteur ampérométrique à AChE immobilisée dans une matrice sol-gel : comparaison de l'inhibition obtenue avec des solutions standard (tampon) et après extraction de l'huile d'olive par MIPs (échantillons naturels).*

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Classification et caractéristiques des groupes de pesticides

Tableau 2 : Produits utilisés dans cette étude

Tableau 3 : Protocole de mesure de l'activité enzymatique de l'acétylcholinestérase.

Tableau 4 : Les avantages et les inconvénients des trois méthodes d'immobilisation utilisées.

Tableau 5 : Valeurs des k_i obtenus en ($\mu M^{-1} \cdot min^{-1}$) pour les trois pesticides étudiés

Tableau 6 : Performances des tests en microplaques (immobilisation par adsorption) pour la détection du malaoxon, du méthidathion oxydé et de l'ométhoate
(IC =concentration inhibitrice, $IC10$ =limite de détection)

Tableau 7: Comparaison entre les limites de détection obtenues par les dispositifs basés sur l'adsorption de l'AChE sur des microplaques et les LMRs tolérées par la réglementation française (ppm : partie par million).

Tableau 8 : Performances des tests en microplaques à AChE immobilisée sur les billes magnétiques pour la détection du malaoxon, du méthidathion oxydé et de l'ométhoate (IC = concentration inhibitrice, $IC10$ = limite de détection.)

Tableau 9: Limites de détection des tests en microplaques à AChE immobilisée sur des billes magnétiques appliqués au dosage d'échantillons naturels.

Tableau 10 : Performances analytiques du capteur ampérométrique à AChE pour la détection des trois pesticides étudiés (IC = concentration inhibitrice, $IC10$ = limite de détection.)

Tableau 11: Limites de détection des biocapteurs ampérométriques à AChE immobilisée sur des billes magnétiques appliqués au dosage d'échantillons naturels.

Tableau 12: Comparaison entre les limites de détection obtenues par les dispositifs mettant en jeu des billes magnétiques et les LMRs tolérées par la réglementation française. (ppm : partie par million)

Tableau 13 : Performances analytiques du dispositif optique à AChE immobilisée dans une matrice sol-gel pour la détection des trois pesticides étudiés

Tableau 14 : Performances analytiques du capteur ampérométrique à AChE immobilisée dans une matrice sol-gel pour la détection des trois pesticides étudiés.

Tableau 15: Comparaison entre les limites de détection obtenues par les dispositifs basés sur une immobilisation sol-gel et les LMRs tolérées par la réglementation française. (ppm : partie par million).

Tableau 16 : Protocole d'extraction solide-liquide des insecticides organophosphorés en utilisant les polymères à empreinte moléculaire (MIPs)

Tableau 17 : Taux d'inhibition du biocapteur obtenus après extraction par les MIPs.

Avant-propos

Cette thèse a été réalisée au sein de l’Institut de Modélisation et d’Analyse en Géo-Environnement et Santé (IMAGES, EA4218), Université de Perpignan *Via Domitia*, France, et au sein de l’équipe photocatalyse et environnement du laboratoire AQUAMAR, Université Ibn Zohr d’Agadir, Maroc, sous la direction des professeurs :

Coté français : Monsieur **Thierry Noguer**, directeur de thèse, et Monsieur **Régis Rouillon**, co-directeur de thèse.

Coté marocain : Monsieur **Ihya Ait ichou**, directeur de thèse et Monsieur **Elhabib Ait addi**, co-directeur de thèse.

Les travaux réalisés ont donné lieu à la publication de :

4 articles dans des revues internationales (cf Annexes) :

- ❖ **Najwa Ben Oujji**, Idriss Bakas, Georges Istamboulie, Ihya Ait-ichou, Elhabib Ait-addi, Regis Rouillon, Thierry Noguer. Acetylcholinesterase immobilized on magnetic beads for pesticides detection: Application to olive oil analysis. Sensors 12 (2012) 7893-7904
- ❖ **Najwa Ben Oujji**, Idriss Bakas, Georges Istamboulie, Ihya Ait-ichou, Elhabib Ait-addi, Regis Rouillon, Thierry Noguer. Sol-gel immobilization of acetylcholinesterase for biosensor determination of organophosphate pesticides in olive oil. Journal of Food Control, 30 (2013) 657-661
- ❖ Bakas Idriss, **Ben Oujji Najwa**, Moczko Ewa, Istamboulie Georges, Piletsky Sergey, Piletska ,Elena , Ait-Ichou Ihya, Ait-Addi Elhabib, Noguer Thierry, Rouillon Régis

Molecular imprinting solid phase extraction for selective detection of methidathion in olive oil. *Analytica Chimica Acta*, 734 (2012) 99-105.

❖ Idriss Bakas, **Najwa Ben Oujji**, Ewa Moczko, Georges Istamboulie, Sergey Piletsky, Elena Piletska , Ihya Ait-Ichou , Elhabib Ait-Addi , Thierry Noguer , Régis Rouillon. Computational and experimental investigation of molecular imprinted polymers for selective extraction of dimethoate and its metabolite omethoate from olive oil. *Journal of chromatography A*, 1274 (2013) 13– 18.

7 communications orales

- I.Bakas, **N. Ben Oujji**, G. Istamboulie, E. Moczco, E. Ait-Addi, R. Rouillon, J-L. Marty, I. Ait-Ichou . T. Noguer . Use of molecular modelling to design molecularly imprinted polymers for selective extraction of organophosphorus insecticides from olive oil, XVI èmes Rencontres transfrontalières « CAPTEURS ET BIOCAPTEURS », Toulouse (France), 29-30 septembre 2011.
- **Ben Oujji Najwa**, Bakas Idriss, Istamboulie Georges, Ait-Addi Elhabib, Rouillon Régis, Ait-Ichou Ihya , Noguer Thierry. Biocapteur à acétylcholinestérase pour la détection des insecticides organophosphorés utilisés en oléiculture. 2ème Colloque International «chimie, environnement et développement durable», Rabat (Maroc), 20 - 21 Octobre 2011.
- Bakas Idriss , **Ben Oujji Najwa**, Istamboulie Georges, Moczko Ewa, Piletsky Sergey, Ait-Addi Elhabib, Noguer Thierry, Ait-Ichou Ihya, Rouillon Régis. Modélisation moléculaire et synthèse des polymères à empreintes moléculaires (MIPs) pour la pré-concentration des insecticides organophosphorés à partir des solvants organiques polaire et apolaire et d'huile d'olive. 2ème Colloque International «chimie, environnement et développement durable», Rabat (Maroc), 20 - 21 Octobre 2011.
- **Ben Oujji Najwa**, Bakas Idriss, Istamboulie Georges, Ait-Addi Elhabib, Rouillon Régis, Ait-Ichou Ihya, Noguer Thierry. Développement de biocapteur pour la

détection des organophosphorés utilisés pour le traitement des oliviers. 1^{er} Congrès Pluridisciplinaire des Doctorants de l'UPVD, Perpignan (France) 7-8 juin 2012.

- Bakas Idriss, **Ben Oujji Najwa**, Istamboulie Georges, Moczko Ewa, Piletsky Sergey, Ait-Addi Elhabib, Noguer Thierry, Ait-Ichou Ihya, Rouillon Régis. Polymères à empreintes moléculaires (MIPs) pour la pré-concentration des insecticides organophosphorés à partir d'huile d'olive. 1^{er} Congrès Pluridisciplinaire des Doctorants de l'UPVD, Perpignan (France) 7-8 juin 2012.
- Bakas Idriss, **Ben Oujji Najwa**, Istamboulie Georges, Moczko Ewa, Piletsky Sergey, Ait-Addi Elhabib, Noguer Thierry, Ait-Ichou Ihya, Rouillon Régis. Extraction solide-liquide par des polymères à empreintes moléculaires (MIP) et détection par CLHP et biocapteur enzymatique des résidus d'insecticides organophosphorés dans l'huile d'olive. 42^{ème} Congrès du Groupe Français des Pesticides, ENSI-Poitiers (France) 30 mai -1^{er} juin 2012.
- **Ben Oujji Najwa**, Bakas Idriss, Istamboulié Georges, Ait-Ichou Ihya, Ait-Addi Elhabib, Rouillon Régis and Noguer Thierry. Biosensors based on immobilisation of acetylcholinesterase on magnetic microbeads and sol gel for detection of organophosphorus used for the treatment of olive trees. Second International Conference on Analytical and Nanoanalytical Methods for Biomedical and Environmental Sciences, Brasov (Roumanie), 24-27 Mai 2012.

3 communications par affiche

- **Ben Oujji Najwa**, Bakas Idriss, Istamboulie Georges, Moczco Ewa, Ait-Ichou Ihya, Ait-Addi Elhabib, Rouillon Régis, Marty Jean-Louis, Noguer Thierry. Biosensors and MIPs for organophosphate control in olive. XV Trobada Transfronterera de Sensors i Biosensors - Sant Carles de la Ràpita (Espagne), 16-17 Septembre 2010.
- **Najwa Ben Oujji**, Idriss Bakas, Georges Istamboulie, Elhabib Ait-Addi, Ihya Ait-Ichou, Régis Rouillon, Thierry Noguer. Biosensor for the detection of

organophosphates used in the treatment of olive trees. XVI^{èmes} Rencontres Transfrontalières Capteurs et Biocpateurs, Toulouse (France), 29-30 septembre 2011.

- I. Bakas, N. Ben Oujji, G. Istamboulie, E. Moczco, I. Ait-Ichou, E. Ait-Addi, R. Rouillon, J-L. Marty, T. Noguer. Synthèse et utilisation des polymères à empreintes moléculaires (MIP) pour l'extraction des insecticides organophosphorés à partir d'huile d'olive. 9^{ème} congrès francophone de l'AfSep sur les sciences séparatives et les couplages, Toulouse (France), 23-25 mars 2011.

Introduction générale

Introduction

L'olivier est un arbre sacré qui véhicule de nombreux symboles : paix, fécondité, purification, force, victoire et récompense, et qui est connu et utilisé depuis l'antiquité surtout pour son huile. Actuellement le patrimoine oléicole mondial compte environ près d'un milliard d'oliviers cultivés à travers le monde, dont 90 % sont cultivés dans le bassin méditerranéen. La grande partie de la production de ces oliviers est utilisée spécialement pour la fabrication de l'huile d'olive. Riche en acides gras et en produits polyphénoliques, l'huile d'olive est connue pour ces bienfaits pour la santé humaine. Avec la promotion actuelle de ces vertus bénéfiques, la demande mondiale ne cesse d'augmenter et par conséquent la production croît constamment pour répondre aux besoins des consommateurs. Néanmoins, les attaques des ravageurs et des maladies comme la mouche blanche, le néïroun, le psylle et la cochenille noire, nécessitent l'application de produits phytosanitaires pour lutter contre ces nuisibles et maintenir un bon rendement. Ces pesticides, majoritairement des organophosphorés et des carbamates, conduisent à des résultats intéressants. Cependant, leurs résidus détectés dans l'huile et dans les fruits présentent un risque majeur pour la santé des consommateurs. Devant une réglementation très stricte, un suivi régulier de l'analyse de ces résidus est devenu une nécessité afin de s'assurer de la conformité du produit mis sur le marché.

Les méthodes classiques de détection des pesticides organophosphorés (OPs) s'appuient sur une analyse par des méthodes conventionnelles comme la chromatographie avec détection spécifique. Bien que ces techniques soient très puissantes et capables de détecter de très faibles concentrations, elles sont relativement coûteuses, complexes, et doivent être réalisées dans des laboratoires spécialisés par du personnel qualifié.

Une alternative possible à l'utilisation de ces méthodes sophistiquées réside dans l'utilisation de méthodes biochimiques basées sur des tests enzymatiques ou immunologiques. Les

insecticides OPs et carbamates peuvent être déterminés par des telles méthodes, qui ont ensuite été appliquées au développement de biocapteurs enzymatiques. L'objectif du développement d'un biocapteur est d'aboutir à un dispositif peu coûteux, de taille réduite (portatif) permettant de détecter, d'alerter, voire de doser directement l'analyte d'intérêt, de façon rapide, et de préférence sans nécessiter l'ajout d'autres réactifs ou de prétraiter l'échantillon. Du fait de leur nature biologique, les biocapteurs présentent aussi une grande sensibilité permettant de détecter de très faibles concentrations, avec une grande robustesse et une grande sélectivité.

Le but de ce travail est de mettre au point des méthodes enzymatiques pour la détection de trois organophosphorés utilisés pour le traitement des oliviers : le malathion, le méthidathion et le diméthoate sous leurs formes oxydées. Il s'agit du développement de biocapteurs enzymatiques colorimétriques ou ampérométriques basés sur l'inhibition de l'acétylcholinestérase (AChE). Ce sujet a été abordé auparavant par plusieurs études qui ont abouti à la réalisation de biocapteurs sensibles et sélectifs pour la détection de plusieurs organophosphorés et carbamates. Ces études se sont basées sur l'utilisation d'une combinaison de différentes acétylcholinestérases, certaines modifiées génétiquement, et de la phosphotriestérase pour améliorer la sélectivité et la sensibilité du capteur. Dans ce travail, nous avons essayé de diminuer le coût des outils développés ainsi que la complexité du système en immobilisant uniquement l'acétylcholinestérase sauvage d'anguille électrique qui est facilement manipulable et disponible sur le marché à faible coût. Pour augmenter la sensibilité et la sélectivité de nos biocapteurs, une étape d'extraction a été ajoutée en amont de la détection, basée sur l'utilisation des polymères à empreinte moléculaire (MIPs). Les MIPs utilisés ont été développés et optimisés spécifiquement pour les trois pesticides concernés par cette étude dans le cadre d'une thèse complémentaire rentrant dans le même projet que celle-ci. D'autre part, l'innovation de notre travail vient du choix de la matrice

concernée par cette étude, l'huile d'olive, qui en raison de sa consistance lipidique présente des problèmes analytiques à la fois pour l'extraction et l'analyse des résidus de pesticides qu'elle peut contenir.

Contrairement à la majorité des capteurs décrits dans la littérature, les biocapteurs mis au point au cours de ce travail sont basés sur l'inhibition de l'enzyme par les organophosphorés et non sur le dosage du substrat de celle-ci. Les organophosphorés, qui représentent plus de 40 % des insecticides employés aujourd'hui dans le monde, sont des neurotoxiques qui sont reconnus par leur propriété d'inhiber les cholinestérases de manière irréversible, en provoquant la phosphorylation du site actif de celles-ci. Ces produits phytosanitaires présentent un risque potentiel pour la santé humaine, les animaux et l'environnement, une exposition prolongée à ces produits peut provoquer des vertiges, vomissements, attaques, paralysies, pertes des fonctions mentales et, éventuellement, la mort.

Dans ce travail, après avoir déterminé les paramètres cinétiques et la sensibilité de l'acétylcholinestérase vis-à-vis des trois pesticides par spectrophotométrie, l'enzyme a été immobilisée sur la surface de deux support différents : des électrodes fabriquées par sérigraphie, et des plaques de microtitration de type ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay, littéralement «dosage d'immunoabsorption par enzyme liée»). Trois méthodes de fixation ont été testées : l'immobilisation par bioencapsulation dans une matrice sol-gel, l'immobilisation par liaisons covalentes sur des billes magnétiques et l'immobilisation par adsorption. La détermination des performances analytiques des biocapteurs développés a été réalisée en utilisant des solutions standards de pesticides et leur viabilité a été démontrée par le dosage d'échantillons naturels d'huile d'olive, après une simple extraction liquide-liquide. Une comparaison de la performance analytique des différents biocapteurs développés a été réalisée et le biocapteur le plus performant a été optimisé afin d'augmenter sa sensibilité et sa sélectivité, en utilisant les MIPs comme outil d'extraction des pesticides.

Dans ce manuscrit, le premier chapitre est consacré à une revue bibliographique axée sur le principe des biocapteurs, des généralités sur les pesticides, une présentation du secteur oléicole au Maroc et en France et des généralités sur les MIPs. La deuxième partie présentera le matériel utilisé, les méthodes d’immobilisation et les méthodes de détection, et la troisième partie, quant à elle, présentera les résultats obtenus, leurs interprétations, les conclusions tirées et les perspectives de recherche.

Etude bibliographique

I. ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. Biocapteur

La détection d'une espèce biochimique ainsi que l'évaluation de sa quantité (ou de sa concentration) nécessite l'utilisation d'instruments d'analyse généralement complexes, coûteux et volumineux tels que les chromatographes ou les divers spectromètres. Depuis l'année 1960, au cours de laquelle Clark et Lyons ont développé le premier biocapteur, la recherche dans le domaine a connu un développement considérable en raison des nombreuses applications potentielles, que ce soit dans le domaine médical, agroalimentaire ou du contrôle environnemental (Helali, 2005).

Les biocapteurs peuvent être définis comme des outils analytiques résultant de l'association d'un élément biologique sensible (une enzyme, un anticorps, une cellule....) et d'un transducteur physique (figure 1) qui permet la conversion d'un signal biologique en un signal physique qui est ensuite mesuré et enregistré (Coulet, 1991). L'objectif du développement d'un biocapteur est d'aboutir à un dispositif de taille réduite (portatif) permettant de détecter, d'alerter, voire de doser directement un polluant (des insecticides organophosphorés dans notre étude), de façon rapide, de préférence sans nécessiter l'ajout d'autres réactifs ou de prétraitement de l'échantillon (Dejous, 2005).

Selon Dejous (2005), un biocapteur est composé de trois éléments principaux :

- ⇒ Le biorécepteur, il s'agit du matériel biologique qui assure la reconnaissance de l'élément cible (signal d'entrée).
- ⇒ Le transducteur, qui assure la conversion de ce signal d'entrée (événement de reconnaissance moléculaire) en un signal mesurable.

I. Étude bibliographique

⇒ Le conditionneur, qui peut assurer des rôles d'amplification, acquisition et traitement du signal, pour le transformer en une information dans un format approprié pour l'utilisateur.

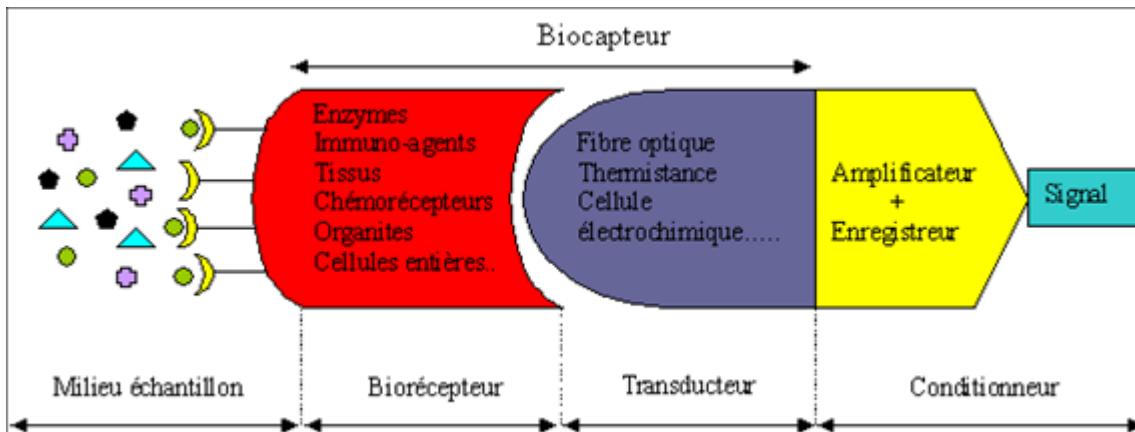


Figure 1 : Représentation schématique d'un biocapteur (d'après C.T.Minh, 1991)

Les biocapteurs peuvent être classés suivant différents types de critères (Guedri, 2010) :

- ⇒ Par type de biorécepteur : biocapteurs enzymatiques, immunologiques, à cellules entières...
- ⇒ Par type de transducteur : biocapteurs optiques, électrochimiques, thermiques...
- ⇒ Par type de réaction suivie : biocapteurs à affinité, à catalyse, à hybridation, à empreinte moléculaire...

Les premiers capteurs étudiés ont été les capteurs enzymatiques, en raison de la disponibilité de nombreux enzymes dans le commerce et aux progrès de l'ingénierie génétique qui ont permis d'élargir le spectre des enzymes en les rendant plus stables, plus sensibles et plus sélectives pour l'espèce d'intérêt. Les capteurs développés dans ce travail utilisent comme biorécepteur une enzyme qui appartient à la famille des hydrolases : l'acétylcholinestérase.

I. Étude bibliographique

Bien que cette enzyme ne génère pas naturellement d'espèces électroactives, ce problème peut être contourné en utilisant un substrat synthétique : l'acétylthiocholine (Andreescu *et al.*, 2002). Ces capteurs sont, contrairement à la majorité des capteurs décrits dans la littérature, basés sur l'inhibition de l'enzyme et non sur le dosage du substrat de celle-ci (Istamboulie *et al.*, 2009).

I.1.1 Le biorécepteur : acétylcholinestérase

Le biorécepteur est l'élément du biocapteur qui doit assurer la reconnaissance moléculaire du composé à détecter. Il doit présenter, par rapport à cette substance cible, une bonne affinité, une bonne sélectivité, ainsi qu'une réponse rapide (Déjous, 2005). Au moins trois types de molécules biospécifiques peuvent jouer le rôle de biorécepteur: les immunoespèces (anticorps, antigène), les enzymes et les acides nucléiques (ADN, ARN), qui servent à concevoir respectivement des capteurs immunologiques, des capteurs enzymatiques, et des biopuces. Il est également possible de concevoir des biocapteurs à base de cellules entières.

Dans notre étude, le biorécepteur utilisé est une enzyme qui appartient à la famille des hydrolases : l'acétylcholinestérase dont les caractéristiques sont présentées ci-dessous.

I.1.1.1. Rôle physiologique et structure

Dans les jonctions neuromusculaires et interneurales, la terminaison nerveuse libère un médiateur chimique, l'acétylcholine, qui va permettre la transmission de l'influx nerveux. Lors d'une stimulation nerveuse, l'acétylcholine libérée des terminaisons nerveuses dans l'espace synaptique, active les récepteurs cholinergiques post-synaptiques. L'interaction de

I. Étude bibliographique

l'acétylcholine avec le récepteur provoque une dépolarisation de la membrane post-synaptique, générant ainsi un potentiel d'action qui assure la transmission du signal nerveux. L'hydrolyse de l'acétylcholine par une enzyme (acétylcholinestérase), permet au système de revenir à son état de repos (Bocquené *et al.*, 1997) (figure 2).

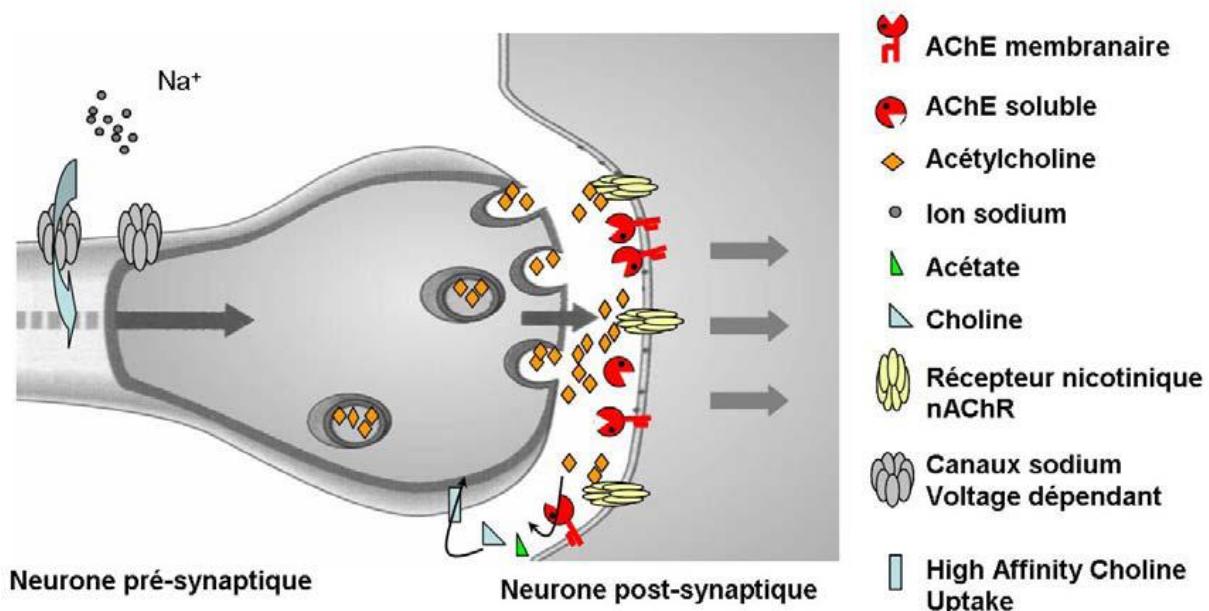


Figure 2 : Hydrolyse de l'acétylcholine par l'AChE au niveau de la synapse cholinergique.

L'acétylcholinestérase ou « enzyme parfaite » (Quinn, 1987), est une des enzymes les plus efficaces et les plus rapides connues actuellement (une efficacité d'hydrolyse (turnover) de 1000 à 20 000 molécules /seconde selon l'espèce). Elle appartient à la famille des hydrolases et elle est exprimée au niveau du système nerveux central et des muscles, son rôle comme décrit ci-dessus est d'hydrolyser le neurotransmetteur acétylcholine afin de terminer la transmission de l'influx nerveux et restaurer ainsi l'excitabilité des synapses cholinergiques.

L'acetylcholinesterase est une protéine complexe qui possède un centre actif, une multitude de sites périphériques et de nombreux domaines hydrophobes (figure3). Le site actif, région

I. Étude bibliographique

particulière de l'enzyme où se déroule la réaction enzymatique, possède une taille restreinte par rapport à la taille globale de l'enzyme. Ce site actif de l'AChE possède un site catalytique qui peut être décomposé en 2 parties :

- ❖ Le sous-site anionique responsable de la stabilisation du substrat lors de la catalyse par fixation de l'ammonium quaternaire de la partie choline de l'ACh. Il était admis, jusque dans les années 1990, que cette liaison se faisait par interaction électrostatique entre la charge positive de l'ammonium et la charge négative d'un groupement carboxyle libre de l'enzyme (Rosenberry, 1975). Cette interaction est stabilisante, mais en réalité un transfert de charge entre la charge positive de l'ammonium quaternaire de l'ACh et les électrons π du noyau indole du Tryptophane (Trp) l'est beaucoup plus (Gallivan et Dougherty, 1999). Ce sous-site est composé d'une majorité de résidus aromatiques et il est estimé que plus de 50% de l'énergie de stabilisation provient de ce dernier (Badiou, 2007).
- ❖ Le sous-site estérasique, contenant la triade catalytique Ser200, His440 et Glu327 (numérotation d'après la séquence de l'AChE de *Torpedo californica* qui est la première structure tridimensionnelle résolue), Cette triade est localisée à la base d'une gorge étroite de 20 A° de profondeur (Sussman *et al.*, 1991) et qui est alignée de 14 résidus aromatiques. Ce site constitue le lieu de la catalyse (Eldefrawi, 1985) ainsi que la cible de certains insecticides, qui agissent en bloquant de manière irréversible l'enzyme (Remy *et al.*, 1995). Dans un premier temps, la partie acétyle de la molécule d'ACh se fixe et forme un intermédiaire tétrahédrique. Le trou oxyanion favorise la formation de cette intermédiaire en accueillant l'oxygène négativement chargé du carbonyle de l'ACh. L'His440 joue un rôle important en se comportant comme un catalyseur pour la formation et la décomposition de l'intermédiaire. Au sein du sous-site estérasique se trouve une petite cavité hydrophobe appelée, poche acyle, qui

I. Étude bibliographique

- ❖ stabilise le groupement méthyle de la partie acétate et confère un rôle de sélectivité du substrat. La mutagenèse dirigée a montré que le remplacement des résidus impliqués dans la poche acyle induisait une spécificité plus large de substrat. L'hydrolyse de l'ACh implique la participation du N de l'imidazole de l'histidine qui va attirer le proton de l'hydroxyle de la sérine du site actif, le rendant plus mobile et favorisant l'interaction de l'oxygène de la sérine avec le centre électrophile de l'ACh. Une fois le complexe intermédiaire non covalent enzyme substrat formé (k_{+1}), l'AChE est acétylée par estérification de l'hydroxyle de la sérine active (k_2) et la partie choline est libérée. L'enzyme est régénérée (k_3) lorsque l'atome d'oxygène d'une molécule d'eau, électronégatif, attaque le site électrophile du carbonyle du groupement acétyle produisant de l'acide acétique (Badiou, 2007).

En plus de ce site, l'enzyme possède également un second site actif, appelé "site périphérique anionique" comportant des groupements périphériques secondaires qui permettent la fixation de ligands (Marcel, 1999).

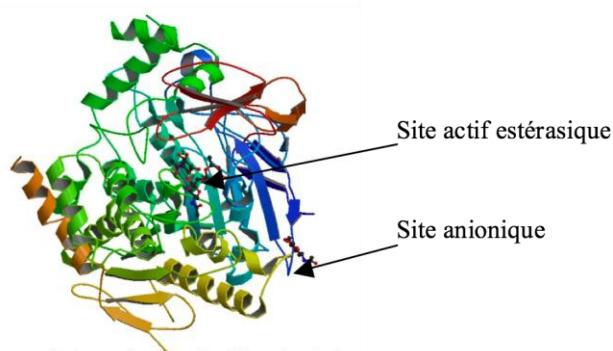


Figure 3 : Représentation schématique de l'acétylcholinestérase (Kryger et al., 1999)

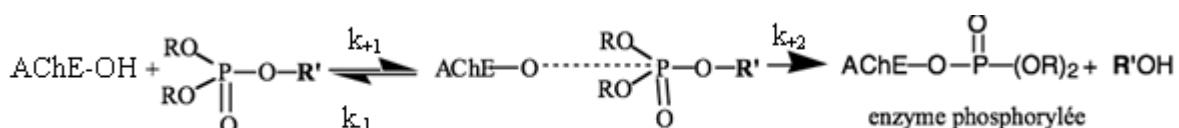
L'utilisation de l'AChE pour la détermination des insecticides a été largement décrite et la littérature propose une gamme variée de systèmes impliquant cette enzyme en solution ou

I. Étude bibliographique

immobilisée. Ces systèmes sont basés sur la détermination de l'activité de l'enzyme avant et après contact avec l'inhibiteur, la diminution d'activité induite est alors fonction de la concentration de l'insecticide. Ce principe représente la base analytique des biocapteurs à AChE pour la détection des insecticides (Istamboulie, 2009).

I.1.1.2. Mécanisme d'inhibition

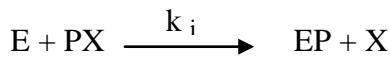
Les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase peuvent être classés selon leurs modes d'action, on cite les inhibiteurs pseudo-irréversibles, irréversibles, analogue d'état de transition et les inhibiteurs réversibles. L'inhibition de l'AChE par de nombreux neurotoxiques tels que les métaux lourds et les organophosphorés provoque une transmission permanente de l'influx nerveux, causant de nombreuses anomalies telles que la paralysie et même la mort (Matozzo *et al.*, 2005). Parmi les inhibiteurs de l'AChE, les plus connus sont certains gaz de combat et les insecticides organophosphorés et carbamates. Le mécanisme d'inhibition par ces derniers est basé sur la formation d'un complexe carbamylé ou phosphorylé qui est plus stable que la forme acétylée. Cependant la forme carbamylée s'hydrolyse rapidement (inhibition réversible) alors que la réactivation de la forme phosphorylée est beaucoup plus lente (inhibition quasi-irréversible) voire impossible (inhibition irréversible) selon la nature de l'organophosphoré (Lotti, 1995). Le mécanisme d'inhibition de l'acétylcholinestérase par les organophosphorés est représenté ci-dessous :



L'inhibition commence par la formation du complexe enzyme-inhibiteur (complexe de Michaelis), suivie par la phosphorylation qui inactive l'enzyme de manière irréversible. La réaction est caractérisée par la constante de dissociation : Kd (=k₋₁/k₊₁) et par la constante

I. Étude bibliographique

d'inactivation k_{+2} (Aldridge, 1950). Ce schéma peut être simplifié en utilisant la constante bi-moléculaire $k_i = k_{+2}/Kd$:



Où E = enzyme, PX = organophosphate et X = groupement partant

L'inhibition peut être suivie en faisant varier le temps d'incubation de l'enzyme avec l'inhibiteur et en déterminant l'activité enzymatique résiduelle en présence de substrat. La disparition de l'enzyme active E obéit à une cinétique du pseudo-premier ordre (Worek *et al.*, 2004) :

$$v = -d[E]/dt = -d[PX]/dt = k_i [E] [PX]$$

L'enzyme phosphorylée peut ensuite subir une désalkylation spontanée provoquant une inhibition irréversible de l'enzyme, ce processus est généralement qualifié de vieillissement ou « aging » (Worek *et al.*, 2005).

I.1.2 Transducteur

Le transducteur est l'élément physique qui sert à exploiter la modification biochimique issue d'une interaction entre un analyte et le biorécepteur pour la transformer en un signal mesurable. Plusieurs types des transducteurs peuvent être utilisés pour la réalisation d'un capteur. Leur choix est principalement déterminé par la nature et les propriétés physico-chimiques de la molécule à détecter, mais aussi par le type d'utilisation du biocapteur (un biocapteur pour l'usage biomédical doit être à usage unique tandis qu'un biocapteur pour le contrôle de l'environnement doit être robuste...) et des possibles interférences (ex : dans les milieux réactionnels troubles, la détection optique n'est pas conseillée....).

Quatre types de transducteurs sont généralement utilisés pour la conception des biocapteurs. Ainsi le transducteur peut être optique (mesurant des changements tels que l'absorbance, la

I. Étude bibliographique

fluorescence ou l'indice de réfraction), mécanique (mesurant un changement de masse qui accompagne une réaction biologique), électrochimique (basé sur le changement des propriétés électriques) ou thermique (mesurant le changement de température accompagnant une réaction endo ou exothermique) (Guedri, 2010).

Cependant, même si les capteurs piézoélectriques, thermiques ou massiques sont actuellement utilisés avec succès, nous nous sommes intéressés aux transducteurs ampérométriques et optiques et à leurs utilisations pour la fabrication des capteurs décrits dans cette étude. Les différents transducteurs utilisés sont décrits ci-dessous.

I.1.2.1 Les biocapteurs électrochimiques

Le principe des capteurs électrochimiques repose sur une réaction d'oxydoréduction, ou une modification de conductivité électrique au niveau de l'interface, qui modifie un signal électrique suite à la fixation de l'élément à analyser. Il existe différents types de biocapteurs électrochimiques comme les capteurs ampérométriques et potentiométriques (Moll, 2007).

Ces transducteurs incluent généralement une ou plusieurs électrodes fonctionnalisées par des composés biologiques et opèrent le plus souvent en milieu liquide.

Actuellement, la quasi-totalité des biocapteurs disponibles sur le marché sont des capteurs enzymatiques ampérométriques. Le principe de mesure est basé sur la mesure du courant généré par l'oxydation ou la réduction d'une espèce électrochimique active à potentiel constant. L'intensité du courant induit est directement proportionnelle à la concentration du substrat. La première génération de capteur ampérométrique décrite mesurait la consommation d'oxygène ou la production d'eau oxygénée. Les enzymes catalysant ces réactions sont généralement des oxydoréductases, mais d'autres enzymes peuvent également

I. Étude bibliographique

être utilisées, si elles conduisent à la formation d'une espèce électroactive (Turner, 1998 ; Hendry *et al.*, 1990).

Selon Guedri (2010), Les biocapteurs ampérométriques peuvent être classés en trois catégories :

- ❖ Les biocapteurs basés sur la mesure de la concentration des substrats naturels ou les produits des réactions enzymatiques. Les enzymes qui catalysent ces réactions sont généralement des oxydases.
- ❖ Les biocapteurs utilisant des médiateurs comme transporteurs d'électrons de l'enzyme active à l'électrode.
- ❖ Les biocapteurs basés sur un transfert direct d'électrons entre l'enzyme active et l'électrode. Ce phénomène est appelé bioélectrocatalyse.

I.1.2.2 Les capteurs optiques

Les transducteurs optiques utilisent les propriétés optiques pour traduire une interaction biochimique. Les variations de la fluorescence ou de l'indice de réfraction de la surface d'un capteur affectent les propriétés optiques du faisceau lumineux qu'elle réfléchit (intensité, phase, polarisation...). Ces informations, transportées par la lumière, sont à la base des capteurs optiques qui forment le plus large groupe de transducteurs (Guedri, 2010). Les capteurs optiques sont constitués généralement d'une source lumineuse, capable de générer une lumière aux caractéristiques désirées, d'un agent entraînant une modulation exploitable de la lumière, d'une zone de détection et d'un photodétecteur. Les capteurs optiques directs ne nécessitent pas de marquage et sont donc plus aisés à utiliser. Néanmoins, l'incorporation d'un marqueur adéquat sur les capteurs optiques indirects en fait un outil très précieux lorsque cette mesure directe n'est pas possible (Baco, 2011).

I. Étude bibliographique

Le grand nombre de spectroscopies différentes (absorption, fluorescence, phosphorescence, Raman, SERS, réfraction, dispersion...) permet d'enregistrer des propriétés spectrochimiques différentes (amplitude, énergie, polarisation...) (Velasco-Garcia, 2009).

I.1.3 Méthodes d'immobilisation

L'immobilisation du biorécepteur constitue un des points critiques de la réalisation des biocapteurs. Elle peut influencer aussi bien la stabilité opérationnelle, la durée de conservation, le temps de récupération, la sensibilité, la gamme linéaire ainsi que l'accessibilité au biocapteur et sa réactivité. Ainsi, il est très important de choisir un procédé d'immobilisation qui préserve le plus possible l'activité, la conformation tridimensionnelle de l'enzyme, spécialement au niveau de son site actif et qui assure la libre diffusion du substrat et du produit de réaction à travers la couche sensible.

Plusieurs procédés ont été élaborés ou en cours d'élaboration (figure 4), ils sont basés essentiellement sur deux grands principes : l'immobilisation chimique et l'immobilisation physique.

Immobilisation physique : l'enzyme est piégée par une membrane ou incluse dans une matrice maintenue à la surface du transducteur, sans échange de liaison entre la molécule et le support. Parmi ces techniques on trouve :

- L'adsorption : c'est la méthode la plus simple et la plus rapide, qui consiste en l'utilisation de liaisons faibles comme des interactions électrostatiques de type Van

der Waals, hydrophobes ou des liaisons hydrogènes pour immobiliser la biomolécule à la surface du transducteur. Bien que cette technique permette une immobilisation simple et non dénaturante de l'enzyme. Elle demeure peu utilisée pour la conception

I. Étude bibliographique

des biocapteurs à cause de la faible quantité de biomolécules immobilisées et leur désorption possible suite aux changements de la température et de la force ionique du milieu, ce qui influence la stabilité et la durée de vie des biocapteurs. Un autre désavantage de cette méthode est le risque de mauvaise accessibilité au site actif, du fait de l'absence de bras espaceur.

- L'inclusion ou piégeage: la méthode d'inclusion consiste à incorporer l'enzyme dans un gel insoluble. Ce gel peut être constitué d'une matrice organique (polymère) (Bratov, 1995 ; Wan, 1999) ou inorganique (argiles) (Besombes, 1994). Dans les deux cas, l'enzyme est mélangée au matériau, puis déposée à la surface d'un biocapteur sous certaines conditions. L'enzyme se trouve piégée mécaniquement à l'intérieur des matrices polymériques ou inorganiques. La maille de la matrice assure de manière purement physique la rétention de l'enzyme tout en permettant la diffusion du substrat jusqu'au site actif de l'enzyme grâce à une porosité du gel suffisante. Toutefois, cette technique est parfois limitée par la taille des pores du gel qui favorise le relargage des enzymes de faible poids moléculaire. L'activité de l'enzyme est dépendante du microenvironnement local de l'enzyme immobilisée (pH, force ionique, diffusion moléculaire, etc.) (Mai, 2004).

Immobilisation chimique : l'enzyme est immobilisée par établissement d'interactions chimiques avec le support (transducteur).

- Couplage covalent : cette méthode d'immobilisation est réalisée par la formation de liaisons fortes entre l'espèce biologique et la surface solide à travers des groupements fonctionnels tels que les groupements carboxylique (-COOH), amine (-NH₂), hydroxyle (-OH) ou thiol (-SH) à la surface solide. Ces groupements sont peu réactifs chimiquement et il convient de les activer pour qu'ils réagissent dans des conditions

I. Étude bibliographique

douces avec des groupements fonctionnels de l'enzyme. Les principaux agents d'activation sont les carbodiimides et le bromure de cyanogène. Cette technique d'immobilisation est particulièrement intéressante car les contraintes diffusionnelles sont limitées et le relargage de l'élément biologique pratiquement impossible. Néanmoins, les molécules permettant ces liaisons covalentes sont toxiques et peuvent parfois dénaturer la biomolécule.

- La réticulation et la co-réticulation : cette technique est basée sur la création de liaisons chimiques qui renforcent la cohésion de la membrane en utilisant un agent réticulant comme le glutaraldéhyde. La co-réticulation consiste en l'utilisation à la fois d'un agent réticulant et d'une protéine inerte pour faciliter ou améliorer la réticulation. L'utilisation de cette protéine permet, par une meilleure répartition des masses des différentes protéines, une meilleure maîtrise de l'activité enzymatique sans altérer les propriétés mécaniques des membranes obtenues. Cependant, une perte d'activité enzymatique de la membrane co-réticulée peut être observée pendant les mesures (Mai, 2004).

Dans ce travail, les biocapteurs ont été réalisés par trois méthodes d'immobilisation différentes :

- L'adsorption.
- La liaison covalente sur des billes magnétiques.
- Le piégeage dans une matrice de sol gel.

I. Étude bibliographique

Le principe de ces trois méthodes sera détaillé ultérieurement dans la partie « matériels & méthodes ».

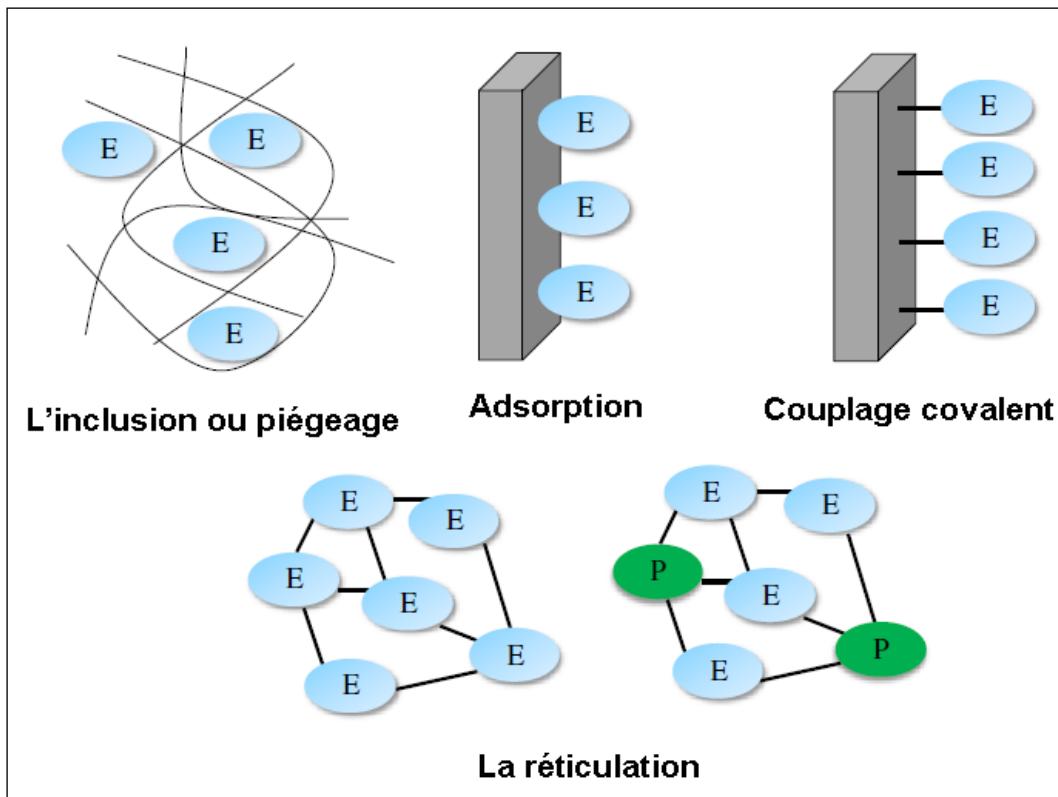


Figure 4 : Les différentes méthodes d'immobilisation, E : enzyme ; P : protéine inerte.

I.2. Les pesticides

Leur nom officiel est produit agrochimique, le nom scientifique est produit antiparasitaire à usage agricole, le nom employé par les professionnels est produit phytosanitaire, tandis que le terme utilisé par le grand public est pesticide (Fournier, 1988). La première utilisation de ces produits en agriculture date de l'antiquité, leur développement ayant ensuite suivi celui de la chimie minérale.

Un pesticide peut être défini comme une substance destinée à repousser ou à combattre toute espèce indésirable végétale ou animale, pendant la production, le stockage, le

I. Étude bibliographique

transport, la distribution ou la transformation des denrées destinées à l'alimentation humaine ou animale. Ce terme désigne aussi toute substance destinée à servir comme régulateur de la croissance, défoliant ou dessiccateur (Chassard-Bouchaud, 1995).

D'après l'EPA, les principaux groupes (tableau 1) et sous produits de pesticides sont :

1. Les insecticides, destinés à tuer les insectes sont principalement des composés chlorés, des organophosphorés, des carbamates, des pyréthrénoides, des produits botaniques et biologiques.
2. Les herbicides, permettant d'éliminer les mauvaises herbes sont des phenoxydes, des triazines, des amides, des carbamates, des dinitro-anilines dérivés d'urée, des sulfonylurées et uraciles.
3. Les fongicides, permettant la destruction de champignons pathogènes sont principalement des composés inorganiques, des dithiocarbamates, des benzimidazoles, des triazoles ou diazoles, des diazines et des morphines.
4. Les huiles minérales.
5. Les régulateurs de croissance de plantes.
6. Les rodenticides, permettant la destruction des rongeurs.

D'autre part et selon les textes relatifs à la réglementation européenne, on distingue 2 grands groupes (Merhi, 2008) :

❖ les produits phytopharmaceutiques (au sens de la Directive 91/414/CE du 15 Juillet 1991) : ils sont utilisés principalement pour la protection des végétaux en agriculture contre les attaques de champignons parasites, d'insectes, d'acariens, de rongeurs champêtres ou encore pour lutter contre les adventices ou "mauvaises herbes". Leurs utilisations peuvent s'élargir dans d'autres secteurs (sylviculture, aménagement des paysages et entretien des abords d'axes de transport, jardinage amateur). Le décret n°94-359 du 5 mai 1994 relatif au contrôle des produits phytopharmaceutiques désigne par produits phytosanitaires « les

I. Étude bibliographique

substances actives et les préparations contenant une ou plusieurs substances actives qui sont présentes sous la forme dans laquelle elles sont livrées à l'utilisateur et destinées à :

- protéger les végétaux ou les produits végétaux contre tous les organismes nuisibles ou à prévenir leur action.
- exercer une action sur les processus vitaux des végétaux, pour autant qu'il ne s'agisse pas de substances nutritives (par exemple, les régulateurs de croissance).
- assurer la conservation des produits végétaux, pour autant que les substances ou produits ne fassent pas l'objet de dispositions particulières du Conseil ou de la Commission concernant les agents conservateurs ;
- détruire les végétaux indésirables, ou détruire des parties de végétaux
- freiner ou prévenir une croissance indésirable des végétaux.

❖ Les biocides (au sens de la directive 98/8/CE) : les produits dénommés anciennement « pesticides à usage non agricole » sont maintenant appelés « produits biocides ». Ils concernent « les substances actives et les préparations contenant une ou plusieurs substances actives destinées à détruire, repousser ou rendre inoffensifs les organismes nuisibles, à en prévenir l'action ou les combattre de toute autre manière par une action chimique ou biologique ». Les biocides sont destinés à des usages domestiques, par exemple dans des applications comme la protection du bois contre les champignons ou les termites, les insecticides ménagers, les produits antiparasitaires (anti-acariens, antipuces), etc.

I. Étude bibliographique

Tableau 1 : Classification et caractéristiques des groupes de pesticides

	Classes	Exemples	Utilisation/Action	Caractéristiques
Insecticides	Organochlorés	DDT, aldrine lindane, chlordane	Paralysie et mort des insectes	Bioaccumulation Bioamplification
	Organophosphorés	Parathion, Diazinone, Malathion	Neurotoxique	Persistances dans les milieux Hydrosolubles
	Carbamates	Carbaryl Aldicarbe	Neurotoxique	Hydrosolubles
Herbicides	Les Triazines	Atrazine	Agit sur la photosynthèse Utilisé dans les cultures de maïs	Très hydrosoluble Toxique pour le phytoplancton et les algues d'eau douce
	Dérivé des pyridines	Paraquat	Désherbant de la vigne	Lésions pulmonaires irréversibles
	Les Urées substituées	Diuron	Inhibiteur de la photosynthèse	Toxicité faible pour l'homme
	Les acides organiques	Glyphosate	Désherbant total	Toxicité faible due à la pénétration difficile dans les feuilles
Fongicides		Pentachlorophénol (PCP)	Tue les champignons lignivores	Hautement toxique pour l'homme

Malgré leur rôle très important en raison de leur capacité à limiter les insectes, les mauvaises herbes et les autres parasites, la plupart des pesticides présentent un risque potentiel pour la santé humaine, les animaux ou l'environnement car ils sont extrêmement toxiques et peuvent provoquer des problèmes de santé graves tels que certains cancers, des malformations congénitales, des problèmes d'infertilité, des problèmes neurologiques, un affaiblissement du système immunitaire, et d'autres effets qui peuvent apparaître au cours du temps.

I. Étude bibliographique

L'influence des pesticides sur la santé humaine et l'environnement dépend en grande partie de la quantité appliquée annuellement dans un pays ou dans une zone, de leurs propriétés toxicologiques et écotoxicologiques et de leur persistance dans le sol et dans l'eau. L'organisation mondiale de la santé (OMS) classe les pesticides par dangerosité en se basant sur leur dose létale (DL) médiane orale ou cutanée, et plus précisément sur la DL50 (nombre de milligramme de matières actives par kilogramme de masse corporelle, nécessaire pour tuer 50% d'un échantillon test d'animaux). Chaque pesticide peut être alors placé dans une des quatre classes suivantes :

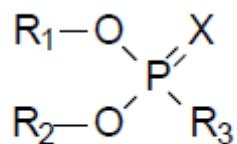
- ⇒ Ia, extrêmement dangereux.
- ⇒ Ib, très dangereux.
- ⇒ II, modérément dangereux.
- ⇒ III, légèrement dangereux.

I.2.1 Les organophosphorés

Parmi les pesticides, les composés organophosphorés (OPs) sont les plus utilisés et les plus variés sur le marché actuellement, ils représentent plus de 40 % des insecticides employés aujourd'hui dans le monde (Andreescu, 2002). Ces produits font partie de la seconde génération d'insecticides, ils ont été développés à partir d'armes chimiques utilisées durant la Seconde Guerre Mondiale (Istamboulie, 2009). Les OPs présentent une structure générale incluant un groupement phosphate ($P=O$) ou phophorothioate ($P=S$) (figure 5), un groupement partant R3, sensible à l'hydrolyse et échangeable avec des réactifs nucléophiles, et deux substituants R1 et R2 possédant une stabilité accrue vis-à-vis de l'hydrolyse (Elisabeth, 2008). Leur action insecticide, tout comme leur toxicité pour les Hommes, vient de l'inhibition

I. Étude bibliographique

irréversible de l'acétylcholinestérase (AChE), qui se trouve bloquée sous une forme phosphorylée inactive. Cette inhibition provoque l'accumulation du neurotransmetteur acétylcholine au niveau de la synapse, provoquant une sur-stimulation cholinergique et ainsi une paralysie du système nerveux entraînant la mort de l'insecte (Fournier, 1988). Pour les êtres humains, l'exposition à ces produits peut être à l'origine d'intoxications aigües (crises cholinergiques) ou entraîner la mort par paralysie musculaire (arrêt cardiaque). L'importance des risques encourus par l'homme implique donc la mise en place de directives permettant de limiter la présence de pesticides organophosphorés dans l'eau et dans l'alimentation.



$$X = O \text{ ou } S$$

Figure 5: Structure générale des organophosphorés.

Dans ce travail nous nous sommes intéressés aux trois pesticides organophosphorés les plus utilisés pour le traitement des oliviers (figure 6), sous leur forme oxydée (-oxon) qui est beaucoup moins stable mais beaucoup plus毒ique que la forme parentale.

I. Étude bibliographique

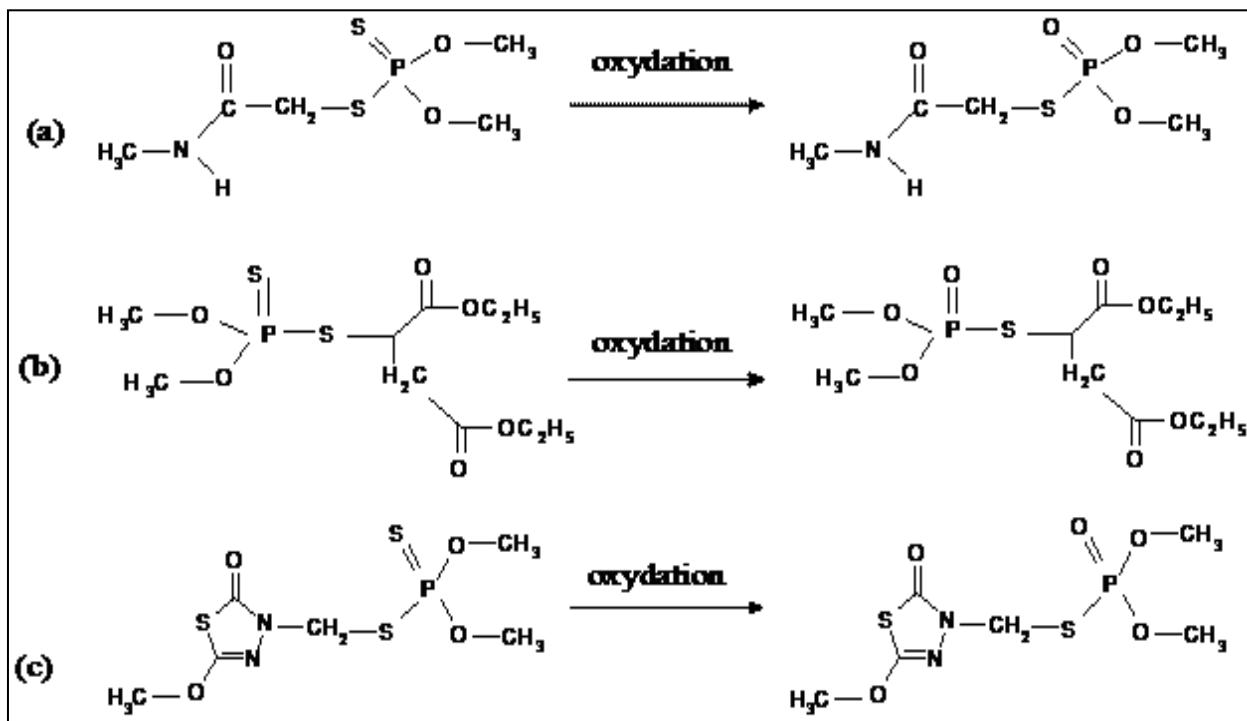


Figure 6 : Structure des organophosphorés et de leurs formes oxydées utilisées dans cette étude : (a) diméthoate et ométhoate, (b) malathion et malaoxon, (c) méthidathion et méthidathion oxydé.

Le texte réglementaire AF920805 détermine les limites maximales de résidus (LMR) dans l'huile d'olive et l'olive de table à 0.5 mg/kg pour le malathion, 2 mg/kg pour le dimethoate et 1 mg/kg pour le méthidathion. Ces LMR correspondent au niveau maximum de résidus de pesticides (ou de leurs métabolites) admissibles dans un produit alimentaire.

I.3. L'huile d'olive

De nos jours, il y a près d'un milliard d'oliviers cultivés à travers le monde dont 90 % sont cultivés dans le bassin méditerranéen, notamment en Espagne, en Italie et en Grèce. Ces oliviers sont cultivés en fonction de leur objectif final, de ce fait les olives récoltées peuvent être utilisées soit en tant que fruit entier (olives de table), ou bien pour la production d'huile d'olive.

I. Étude bibliographique

La production mondiale d'olives de table est d'environ un million de tonnes soit 10 % de la récolte totale d'olives, la grande majorité des olives est donc utilisée pour la fabrication d'huile (Veillet, 2010). L'huile d'olive est le produit méditerranéen par excellence, tant pour ce qui est de sa production que pour sa consommation. On la retrouve à travers l'histoire, depuis la civilisation grecque jusqu'à nos jours. Elle est la principale source de matières grasses du régime crétois ou du régime méditerranéen qui sont bien connus pour leurs effets bénéfiques sur la santé humaine (Veillet, 2010). Actuellement les pays méditerranéens génèrent près de 95 % de la production mondiale d'huile d'olive.

L'importance de l'huile d'olive du point de vue nutritionnel est due essentiellement à sa composition en acides gras, surtout les acides gras poly-insaturés essentiels qui sont non synthétisables par le corps humain, et aussi à certains produits minoritaires tels que les composés phénoliques simples et complexes qui sont reconnus par leur forte capacité antioxydante, qui pourrait prévenir ou ralentir l'apparition de certaines maladies dégénératives ainsi que les maladies cardiovasculaires. En effet, l'huile d'olive réduit la teneur en LDL (low density lipoprotein) dans le sang, réduit aussi la pression artérielle, et semble de plus éviter la formation de caillots sanguins. L'huile d'olive atténue aussi la sécrétion gastrique et elle peut donc soulager les personnes souffrant d'hyperacidité gastrique et de reflux gastro-œsophagien (Artaud, 2008). Avec la promotion actuelle de ses vertus bénéfiques, la demande mondiale en huile d'olive ne cesse d'augmenter et par conséquent la production croît constamment pour répondre aux besoins des consommateurs. Une présentation du secteur oléicole dans les deux pays partenaires de cette étude est réalisée ci-après.

I.3.1 Le secteur oléicole au Maroc

Symbole de l'appartenance au pourtour Méditerranéen, L'olivier constitue la principale espèce fruitière cultivée au Maroc, avec 64 millions de pieds couvrant quelques 650 000 ha,

I. Étude bibliographique

représentant 58 % de la superficie arboricole nationale (DPV, 2009) et donnant une production nationale de 75 000 tonnes d'huile d'olive. Sa tolérance aux conditions pédoclimatiques les plus critiques et sa capacité de croître et de se produire dans diverses situations de culture ont permis à cette espèce de se développer sur pratiquement tout le territoire national. La variété Picholine marocaine représente 96 % des variétés cultivées au Maroc (Walali Loudiyi *et al.*, 1984 ; MAMVA, 1996), pour produire à la fois, les olives de table (4^{ème} rang mondial) et l'huile d'olive. Le reste, soit 4 % est constitué de plusieurs variétés, en particulier la « picholine du Languedoc » et « dahbia » qui sont concentrées dans les zones irriguées (Haouz, Tadla, El Kalâa) et quelques variétés espagnoles et italiennes (picual, frantioi, manzanilla, hojibanca...) (MAMVA, 1996).

Le Maroc est un pays aussi bien producteur que consommateur d'huile d'olive, il occupe le 6^{ème} rang parmi les producteurs du pourtour méditerranéen après l'Espagne, l'Italie, la Tunisie, la Turquie et la Grèce. Le secteur oléicole joue un rôle très important sur le plan socio-économique, il constitue la principale source de revenus pour quelques 400 000 familles, assure plus de 15 millions de journées de travail par an, ce qui est équivalent à 60000 emplois stables, et permet de garantir l'approvisionnement de 334 unités modernes ainsi que de 16 000 unités traditionnelles d'extraction de l'huile d'olive (DPV, 2009).

I.3.2 Le secteur oléicole en France

Les pays de l'U.E. réalisent 80 % de la production mondiale. L'Espagne, l'Italie et la Grèce produisent 97 % de la production totale de l'U.E. et 75% de la production mondiale d'huile d'olive.

La France est un pays importateur bien plus qu'un pays producteur. Avec seulement 3000 tonnes d'huile d'olive produites par an, la France importe aujourd'hui plus de 110 000 tonnes

I. Étude bibliographique

contre moins de 99 000 il y a dix ans. En 2011, la France a importé 64 443 tonnes d'huile d'olive espagnole, environ 5,2 % de plus qu'en 2010. Premier pays producteur et exportateur mondial, l'Espagne, est donc une ressource pour la France sur ce secteur. De tous les pays producteurs, l'Espagne est le leader des ventes en France et près de 57 % de l'huile d'olive consommée en France est issue de ce pays (communiqué de presse).

La consommation française diffère selon les zones géographiques : au nord et au centre, les consommateurs l'utilisent généralement pour assaisonner les salades et sporadiquement pour la réalisation de sauces d'accompagnement. Au sud, plus proches de leurs voisins méditerranéens, les Français ont une tradition culinaire plus ancrée dans l'utilisation quotidienne de l'huile d'olive. Les consommateurs l'emploient régulièrement pour cuisiner, assaisonner, frire, s'approchant ainsi du mode de consommation des espagnols.

I.4. Les polymères à empreinte moléculaire (MIPs)

L'analyse de mélanges complexes tels que les fluides biologiques, les extraits de plantes, les eaux de rejets industriels, les produits agro-alimentaires, etc... constitue une préoccupation majeure des laboratoires de contrôle et de recherche, et nécessite des méthodes analytiques à la fois sensibles et spécifiques. Depuis les années 1990, les travaux publiés montrent l'intérêt porté aux MIPs pour la préparation d'échantillons par extraction solide-liquide.

Un polymère à empreinte moléculaire (notation : MIP, du terme anglais Molecularly-Imprinted Polymer) est défini comme étant un matériau possédant des cavités spécifiques (en forme et en taille) d'une molécule ciblée (Claude, 2007). Les MIPs peuvent reconnaître une molécule voire une famille de molécules analogues, de manière sélective, au sein d'un mélange complexe, contrairement aux supports classiques (supports silice greffée ou polymériques) qui ont une sélectivité parfois insuffisante. Cette reconnaissance moléculaire

I. Étude bibliographique

des MIPs est fondée sur la présence de cavités développant une complémentarité spatiale et fonctionnelle de la molécule recherchée.

La synthèse d'un MIP se fait à partir de monomères et d'une molécule empreinte (molécule autour de laquelle le "moulage" du polymère est réalisé) interagissant au cours de la polymérisation par des liaisons de différentes natures (covalentes ou non). Le mélange constitué est dissous dans un solvant porogène, et l'addition d'un initiateur de polymérisation conduit à la formation d'un MIP en 24 heures environ. Le matériau final, obtenu après l'élimination de la molécule empreinte par des lavages adaptés à la nature des liaisons formées, contient des cavités (sites ou empreintes) gardant mémoire de la molécule empreinte ou des molécules proches en taille et en structure (Claude, 2007) (figure 7).

Les MIPs sont reconnus pour leur forte sélectivité vis-à-vis de leurs molécules cibles, ainsi D.Spivak définit la sélectivité d'un MIP comme la conséquence de la formation de cavités de formes sélectives au sein de la matrice polymérique, issues de la préorganisation de groupes fonctionnels autour de la molécule empreinte (Spivak, 1997)

I. Étude bibliographique

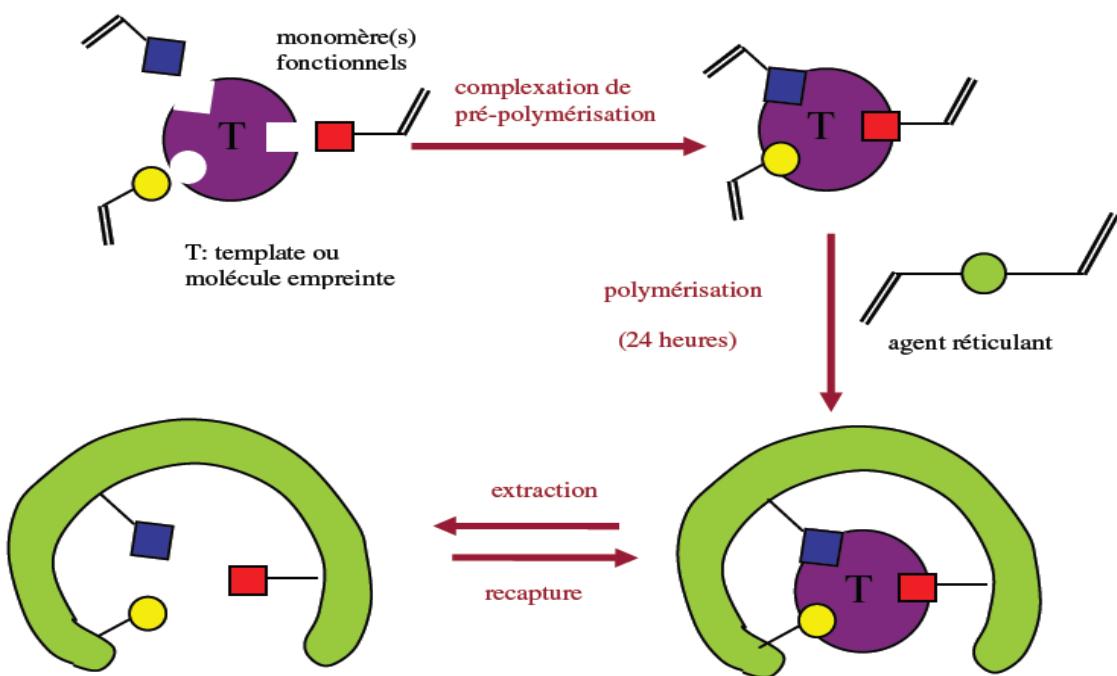


Figure 7 : Principe de formation d'une empreinte moléculaire

Les MIPs utilisés au cours de cette étude ont été préparés par Mr. Bakas au cours de sa thèse de doctorat, dans le cadre du même projet Volubilis, ainsi que des polymères non imprimés (notation : NIP, du terme anglais Non Imprinted Polymer) qui ont été synthétisés en parallèle des MIPs afin de comparer le pouvoir de rétention des deux matériaux et de vérifier la sélectivité de recapture du MIP par rapport au NIP vis-à-vis de la molécule empreinte.

Matériels & Méthodes

II. MATERIELS ET METHODES

II.1. Réactifs utilisés

Le Tableau 2 regroupe tous les produits utilisés au cours de cette étude en fonction de leurs utilisations.

Tableau 2 : Produits utilisés dans cette étude

Enzyme	Acétylcholinestérase (EC 3.1.1.7) d'anguille électrique (<i>Electrophorus electricus</i>)	Sigma-Aldrich
Substrats et réactifs enzymatiques	Chlorure d'acétylthiocholine (ATChCl)	Sigma-Aldrich
	Iodure d'acétylthiocholine (ATChI)	
	Le DTNB (5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid))	
Pesticides organophosphorés	Ométhoate (<i>O,O</i> -diméthyl- <i>S</i> -méthylcarbamoylméthylthiophosphate)	Dr Erhenstorfer (Augsburg)
	Malaoxon diéthyl 2-(diméthoxyphosphorylsulfanyl)butanedioate	
	Méthidathion (3-(diméthoxyphosphinothioylsulfanyl)méthyl)-5-méthoxy-1,3,4-thiadiazol-2-one).	
Oxydation des	N-bromosuccinimide (NBS)	Sigma-Aldrich

II. Matériels & méthodes

pesticides			
Immobilisation	Billes magnétiques	Billes de nickel de 200 nm de diamètre	Aimablement fournies par le Dr Silvana Andreescu de l'Université de Clarkson (USA).
		Glutaraldehyde à 25%	Sigma-Aldrich
		3-(amino-propyl triéthoxysilane)	Sigma-Aldrich
		Acide sulfurique	Carlo Erba
	Sol gel	Tétraméthoxysilane (TMOS),	Sigma-Aldrich
		poly(éthylèneglycol) 600 (PEG)	
		hydroxyéthyl-cellulose (HEC)	
		Acide chlorhydrique (HCl)	Carlo Erba
Tampon phosphate	Na ₂ HPO ₄		Sigma-Aldrich
	KH ₂ PO ₄		
SPE	Plaques de PVC (200 x 100 mm, 0,5 mm)		SKK
	Emulsions Electrodag PF-410, 423SS et 6037SS		Acheson
	Peinture glycérophthalique		Astral

II. Matériels & méthodes

	Cadres et maques en acier inoxydable	DEK Printing Machines Ltd.
	Pâte de carbone modifiée par le cobalt-phtalocyanine (Co-Pc)	Gwent Electronic Materials Ltd

II.2. Matériels

- Les électrodes ont été fabriquées à l'aide d'une machine à sérigraphier semi-automatique DEK 248 (DEK, Weymouth, Royaume-Uni) selon une méthode décrite auparavant (Istamboulie, 2009), un extrait de cette méthode est mentionné ci-dessous.
- Les mesures d'absorbance ont été effectuées sur un spectrophotomètre à barrettes de diodes HP8452A (Hewlett Packard).
- Le matériel utilisé pour effectuer les mesures ampérométriques est composé de :
 - Un potentiomètre Metrohm 641 VA Detector (Metrohm Herisau, Suisse) permettant d'imposer un potentiel constant entre l'électrode de travail et l'électrode de référence.
 - Un enregistreur bi-canal “Flatbed recorder” (Kipp & Zonen, Hollande),
 - Un agitateur magnétique Bioblock AM 3000D,
 - Une électrode sérigraphie fabriquée au laboratoire.
- Pour la détection optique, l'enzyme a été immobilisée sur des micro-plaques PS, forme U, 96 puits (Greiner, Germany), et les mesures ont été réalisées à l'aide d'un lecteur de plaque Labsystems Multiskan EX (Thermo Life Sciences, France).

II. Matériels & méthodes

- Les analyses de chromatographie liquide haute pression en phases inverses ont été réalisées avec un système chromatographique Merck L-2000 series LaChrom Elite® équipé d'une colonne analytique de type phase inverse SupelcosilTM LC-18 (Supelco) (250×4,6 mm, 5µm) et d'un détecteur UV Merck L-4000.

II.3. Méthodes

II.3.1. Étude spectrophotométrique de l'activité enzymatique

II.3.1.1 Détermination de l'activité enzymatique

L'activité enzymatique des enzymes en solution est généralement exprimée en unités internationales (UI), 1 UI étant définie comme la quantité d'enzyme qui catalyse la transformation d'une micromole de substrat par minute ($\mu\text{mole}/\text{min}$). L'activité de l'acétylcholinestérase est déterminée par des mesures spectrophotométriques, basées sur la loi de Beer-Lambert (Istamboulie *et al.*, 2009) :

A= $\varepsilon \cdot C \cdot L$ où

A= absorbance du composé mesurée à une longueur d'onde fixe

ε = coefficient d'extinction molaire ($\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

C= concentration du composé détecté ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

L= longueur du trajet optique dans la cuve (cm)

La réaction enzymatique est étudiée en déterminant l'apparition du produit de la réaction, la mesure de la vitesse initiale (v_i) de la réaction est déterminée en calculant la pente de la partie linéaire de la cinétique (A= f (temps)) exprimée en unités d'absorbance par minute (figure 8).

II. Matériels & méthodes

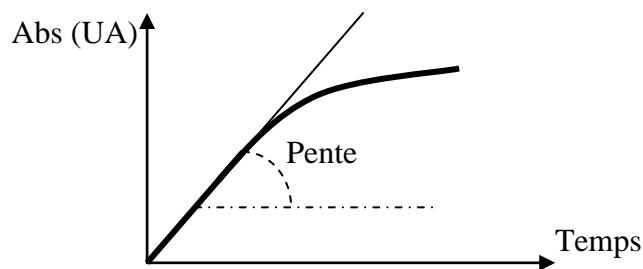
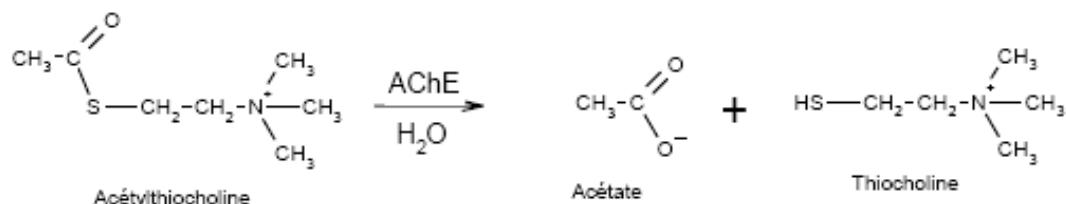


Figure 8: Représentation d'une cinétique enzymatique, $V_t = \Delta A / \Delta t$.

L’enzyme utilisée dans cette étude est l’acétylcholinestérase. La détermination de l’activité enzymatique de cette enzyme est basée sur la méthode d’Ellman (Ellman *et al.*, 1961) qui consiste à lui fournir un substrat synthétique : l’acétylthiocholine, dont l’hydrolyse libère de la thiocholine et de l’acide acétique.



La thiocholine réagit alors avec un agent chromogène, le DTNB (acide 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoïque) présent dans le milieu pour donner un complexe de coloration jaune qui absorbe à $\lambda_{\text{max}} = 412 \text{ nm}$ ($\epsilon = 1,36 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (figure 9).

II. Matériels & méthodes

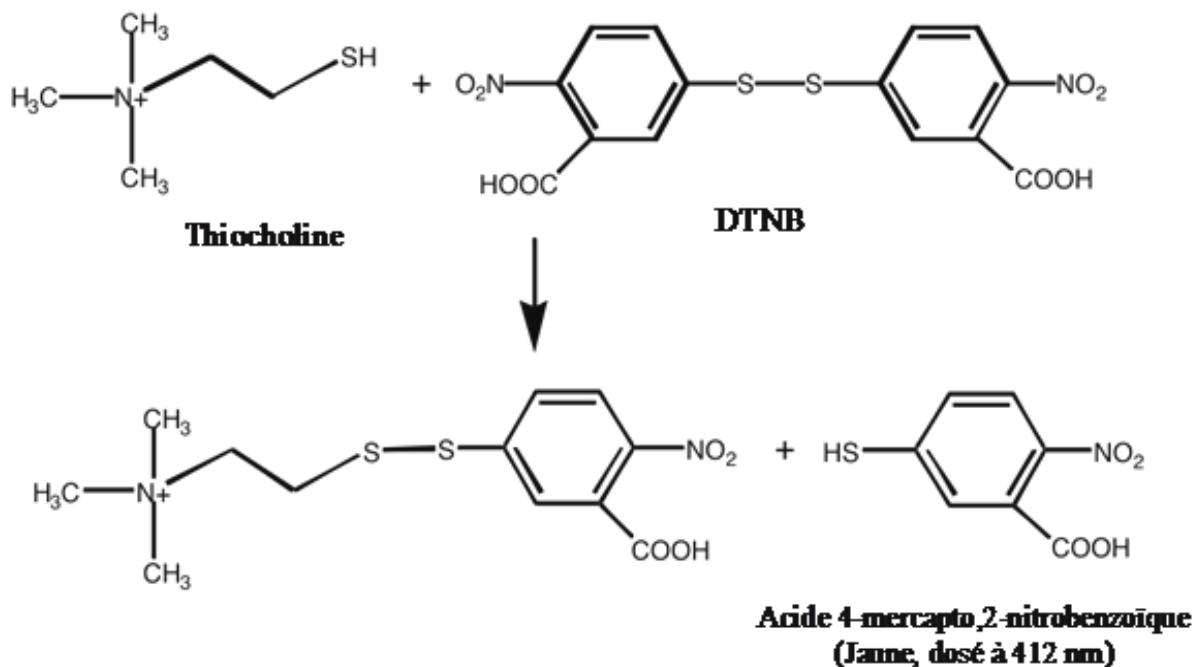


Figure 9 : Détection colorimétrique de la thiocoline par la méthode d'Ellman (1961)

Le protocole pour la détermination de l'activité enzymatique de l'acétylcholinestérase est présenté dans le tableau 3.

Tableau 3 : Protocole de mesure de l'activité enzymatique de l'acétylcholinestérase.

Réactifs (μL)	Blanc	Essai
Tampon phosphate 0,1 M, pH 7	500	490
DTNB 1 mg.mL^{-1}	300	300
Eau distillée	100	100
ATChI (substrat) 10 mM	100	100
AChE (enzyme)	-	10

II. Matériels & méthodes

La réaction enzymatique est initiée par l'ajout du substrat dans la cuve de spectrophotométrie.

La cinétique de la réaction est ensuite suivie à 412 nm (juste après addition du substrat et homogénéisation) pendant 1 min. La pente mesurée dans la partie linéaire de la cinétique permet de calculer la vitesse initiale de la réaction, et donc l'activité enzymatique.

II.3.1.2 Détermination des paramètres cinétiques de l'enzyme

L'activité catalytique d'une enzyme est mise en évidence par l'étude de sa cinétique, c'est-à-dire la vitesse à laquelle elle catalyse une réaction dans les différentes conditions expérimentales. Cette cinétique est décrite par l'équation de Michaelis-Menten.

La détermination des paramètres cinétiques de l'enzyme (la constante de Michaelis K_m et la vitesse maximale de réaction V_{max}) est basée sur le même principe que la détermination de l'activité enzymatique, mais en faisant varier la concentration de substrat dans le milieu réactionnel. Généralement, la vitesse initiale augmente avec la concentration de substrat jusqu'à atteindre la vitesse maximale V_{max} , qui dépend de la concentration d'enzyme. La constante de Michaelis K_m , est déterminée comme la concentration de substrat pour laquelle la vitesse est égale à la moitié de la vitesse maximale de la réaction. Les paramètres cinétiques peuvent être déterminés en utilisant la représentation de Michaelis-Menten (figure 10-a), cependant la représentation en double-inverses de Lineweaver et Burk (figure 10-b) permet une détermination plus précise.

II. Matériels & méthodes

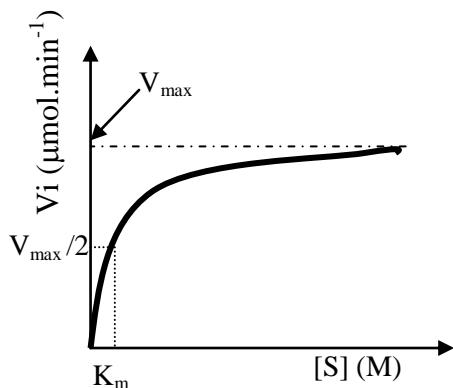


Figure 10-a : Représentation de Michaelis-Menten

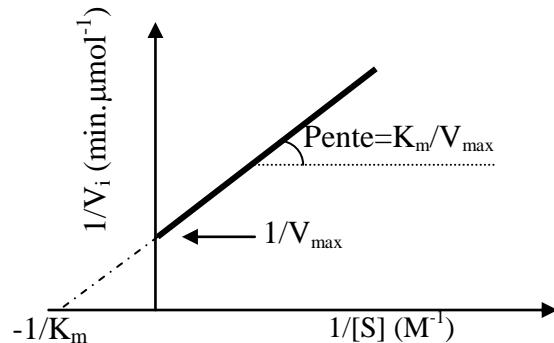


Figure 10-b : Représentation de Lineweaver-Burk

Le calcul de la vitesse maximale V_{\max} permet de calculer l'activité des solutions enzymatiques suivant la relation :

$$\text{Activité (UI.mL}^{-1}) = V_{\max} \times 60/13600 \times 10^6 \times 10^{-3} \times 10^2$$

où : V_{\max} = vitesse maximale en UA/sec, 60 = facteur de conversion en UA.min⁻¹, 13600 = coefficient d'absorbance du DTNB à 412 nm ($M^{-1}cm^{-1}$), 10^6 = facteur de conversion en $\mu\text{mol.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$, 10^{-3} = facteur de conversion en $\mu\text{mol}.\text{min}^{-1}$ (UI) (volume réactionnel 1 mL), 10^2 = facteur de conversion en UI/mL (volume enzymatique 10 μL). Cette relation nous permet de connaître exactement la quantité d'enzyme utilisée pour les tests d'inhibition.

Dans ce travail, les concentrations de substrat utilisées varient entre 0,025 mM et 2 mM en utilisant le même protocole de mesure que décrit dans le tableau 3.

II. Matériels & méthodes

II.3.1.3. Détermination des constantes d'inhibition de l'acétylcholinestérase

Les organophosphorés et les carbamates sont des esters, dérivés amides ou thiols de l'acide phosphorique et des esters N-substitués de l'acide carbamique. Leur structure générale est présentée dans la figure 11 (Ballantyne et Marrs, 1992).

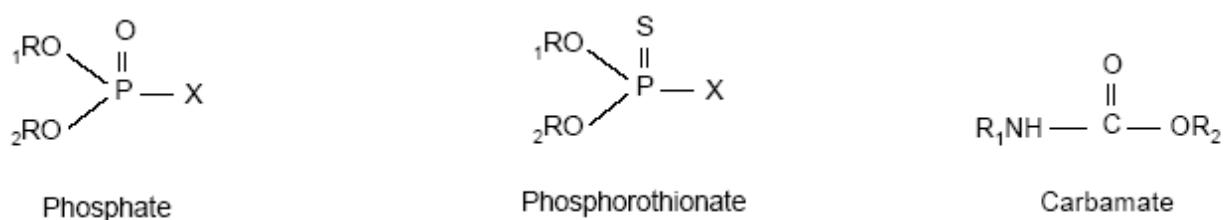


Figure 11: Structures générales des organophosphorés et carbamates (R_1 et R_2 = substituants aliphatiques ou aromatiques).

Ces insecticides agissent sur l'AChE par phosphorylation ou carbamylation de l'hydroxyle de la sérine du site actif, tout comme le fait le substrat ACh lors de l'étape d'acylation (Eldefrawi, 1985), et ils sont considérés comme des pseudo-substrats. Aldridge (1950) a mis au point une technique d'évaluation de la puissance inhibitrice de ces pesticides en se basant sur la diminution de la vitesse d'hydrolyse du substrat en présence d'inhibiteur. Il a mesuré l'activité résiduelle de l'AChE après incubation de l'enzyme avec le paraoxon (OP) à différents temps (Badiou, 2007). En effet, la constante d'inhibition k_i nous renseigne sur le pouvoir inhibiteur d'une molécule vis-à-vis d'une enzyme.

Les déterminations des constantes d'inhibition k_i des insecticides étudiés sont basées sur des mesures spectrophotométriques de l'activité enzymatique avant et après incubation de l'enzyme, en présence de différentes concentrations d'inhibiteur et pour différents temps d'incubation.

II. Matériels & méthodes

Le protocole de la mesure utilisé est le suivant : dans un bain thermostaté à 30°C, on introduit un microtube contenant 800 µL de tampon phosphate 0,1 M pH 7 et 100 µL de solution d'insecticide. A t=0, 100 µL de solution enzymatique sont ajoutés, l'activité enzymatique est mesurée immédiatement à des intervalles de temps déterminés. L'activité résiduelle (%) est déterminée pour chaque temps d'incubation en faisant le rapport entre l'activité au temps t et l'activité initiale. La représentation du logarithme de l'activité résiduelle en fonction du temps de pré-incubation permet d'obtenir une droite dont la pente correspond au k_{obs} (exprimé en min^{-1}) (figure 12-a). La représentation de l'inverse de k_{obs} en fonction de l'inverse de la concentration d'inhibiteur donne une droite dont la pente correspond à l'inverse de la constante d'inhibition k_i (exprimée en $\text{M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) (figure 12-b).

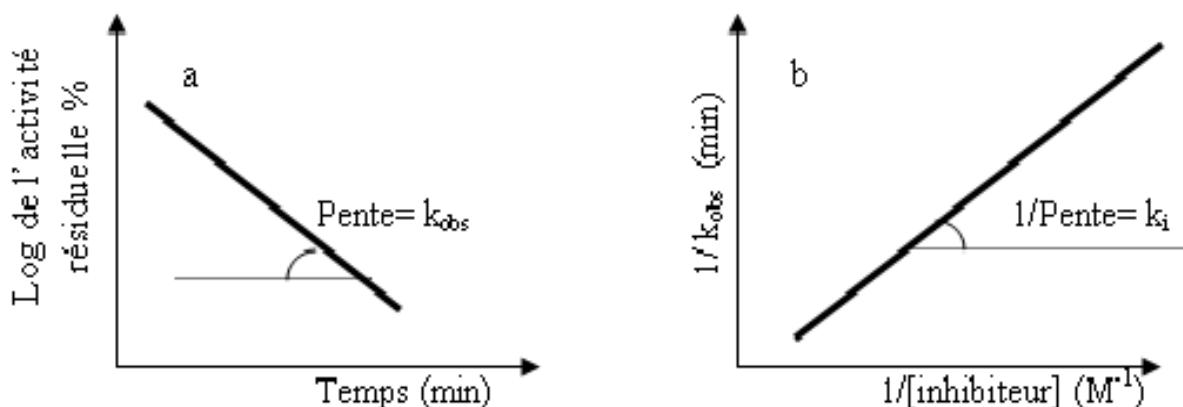


Figure 12 : Méthode de détermination graphique du k_{obs} (a) et du k_i (b).

III.3.2. Méthodes d'immobilisation de l'acétylcholinestérase

L'immobilisation du biorécepteur constitue la première étape de la réalisation d'un biocapteur. Comme décrit auparavant, l'immobilisation peut être définie comme une technique qui limite le déplacement libre de l'élément biologique. La fixation de l'enzyme à la surface du

II. Matériels & méthodes

transducteur physique a pour finalité de pouvoir effectuer un grand nombre d'analyses avec une quantité réduite de biomolécules. Le procédé d'immobilisation utilisé doit conserver au maximum l'activité enzymatique et préserver la conformation tridimensionnelle de l'enzyme, spécialement au niveau de son site actif. Lors de cette étude, la recherche s'est orientée vers trois techniques d'immobilisation: par bioencapsulation dans une matrice sol gel, par adsorption, et par liaison covalente sur des billes magnétiques. Les avantages ainsi que les inconvénients de ces trois méthodes sont résumés dans le tableau 4.

Tableau 4 : Avantages et inconvénients des trois méthodes d'immobilisation utilisées.

Méthodes d'immobilisation	Avantages	Inconvénients
Adsorption	Simple, technique non destructive	Instabilité (désorption de l'enzyme) ; sensibilité aux variations de pH, de température et de force ionique
Procédé sol-gel	Améliore la stabilité de l'activité catalytique de l'enzyme, augmentant sa durée de vie	Barrières de diffusion ; toxicité des intermédiaires de réaction
Couplage covalent sur des billes magnétiques	Grande stabilité ; absence de barrières de diffusion ; accessibilité des substrats et des produits de réaction ; temps de réponse court	Grande quantité d'enzyme ; perte d'activité due à la réaction chimique ; difficilement reproduitible ; toxicité des produits utilisés (glutaraldéhyde)

II. Matériels & méthodes

II.3.2.1. Immobilisation dans une matrice sol gel

Le procédé sol-gel est connu depuis plus de 150 ans grâce aux travaux d'Ebelmen qui a été le premier à décrire la synthèse de la silice à partir d'un alkoxyde de silicium (Ebelmen, 1844). La technique est basée sur l'hydrolyse et la condensation de précurseurs moléculaires tels que des alkoxydes des métaux dispersés dans un solvant organique ou bien des ions métalliques hydroxylés dans des solutions aqueuses. L'évolution de la gélification dépend fortement des précurseurs utilisés. Par exemple, dans le cas où le précurseur utilisé est un alkoxyde de silicium, l'ajout d'un catalyseur acide ou basique est nécessaire pour accélérer les réactions d'hydrolyse et de condensation, tandis que dans le cas des autres alkoxydes, ces réactions doivent être modérées par l'ajout d'un complexant pour éviter leur précipitation. Par conséquent, les cinétiques de gélification et les microstructures finales des gels ne sont pas identiques (Hamd, 2009).

Récemment, ce processus a été utilisé comme méthode physique pour immobiliser une grande variété d'espèces biologiques, y compris des enzymes et des micro-organismes vivants pour différentes applications (Andreeescu *et al.*, 2002; Alvarez *et al.*, 2007). Il semble que l'immobilisation par cette méthode améliore la stabilité de l'activité catalytique de la biomolécule en augmentant sa durée de vie. L'immobilisation des enzymes par ce processus consiste à créer une matrice dans laquelle la protéine peut être piégée avec succès (figure 13). Il s'agit d'un réseau d'oxydes de silicium créé par polymérisation d'un précurseur moléculaire qui conduit à la production d'un gel suite à des réactions d'hydrolyse et de condensation.

Les matériaux sol-gel présentent des propriétés spécifiques qui les rendent particulièrement intéressants pour la fabrication de biocapteurs : rigidité, stabilité thermique et photochimique, et inertie chimique ; cette méthode a déjà été utilisée pour une large variété d'enzymes telles que la tyrosinase, la glucose oxydase et l'acétylcholinestérase (Andreeescu *et al.*, 2002).

II. Matériaux & méthodes

Dans ce travail, la matrice sol-gel a été obtenue par hydrolyse d'un alkoxyde précurseur le tétraméthoxysilane (TMOS), sous des conditions acides (présence de catalyseur HCl), suivie par la condensation des unités hydroxylées, ce qui conduit à la formation d'un gel poreux dans lequel l'acétylcholinestérase est incluse. L'effet de craquement du polymère peut être évité en ajoutant certains agents dopants comme le polyéthylène glycol (PEG), utilisé dans cette étude.

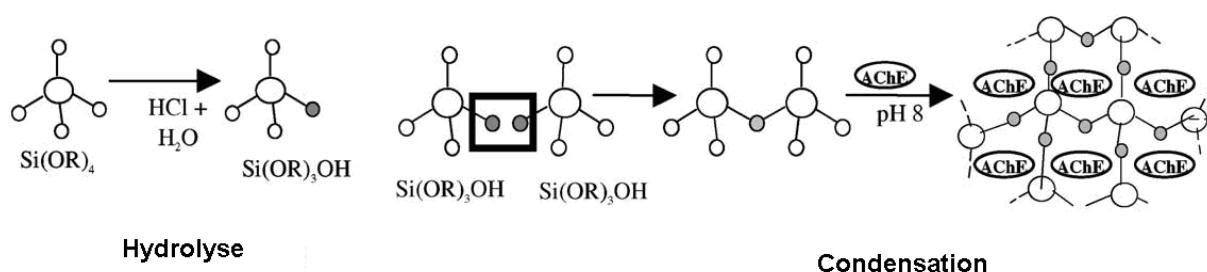


Figure 13 : Immobilisation de l'AChE par encapsulation dans une matrice sol-gel.

Le protocole d'immobilisation utilisé est le suivant : la solution sol-gel est préparée en mélangeant 150 µL du précurseur tétraméthoxysilane (TMOS) avec 413 µL d'eau distillée, 400 µL de HCl 1 mM, et 37 µL de PEG 600. Ce mélange est traité par ultrasons pendant 15 min et placé pendant une nuit à 4°C. La solution enzymatique d'acétylcholinestérase (4.4 UI.mL⁻¹), préparée dans du tampon phosphate (pH 8) est ensuite mélangée (ratio 1 :1) avec une solution d'hydroxyéthylcellulose (HEC) à 2%. Puis, cette solution est mélangée avec la solution sol-gel à un rapport de 2:1 (vol / vol).

- Pour la détection ampérométrique, 3 mUI d'enzyme sont immobilisées par électrode comme suit : 2 µL de la solution sol-gel préparée sont déposés à la micropipette sur la surface de l'électrode de travail. Après 3 heures de séchage à température ambiante,

II. Matériaux & méthodes

l'activité enzymatique est mesurée avant et après incubation avec le pesticide, comme décrit par la suite (§ II.3.3.1).

- Pour la détection optique, 29 mUI d'enzyme sont immobilisées dans chaque puits en déposant à la micropipette 20 µL du mélange sol-gel/enzyme. La microplaqué est ensuite placée à 4°C pendant une nuit avant utilisation. La mesure de l'activité enzymatique est effectuée à partir de 200 µL d'un mélange contenant 2 mM d'ATCh-I et 6% de DTNB dans le tampon phosphate à pH 8. Après 30 min d'incubation, l'absorbance est mesurée à 405 nm à l'aide d'un lecteur de microplaqué. L'inhibition par les pesticides est mesurée par la même méthode, après une incubation pendant 10 minutes en présence de 100 µL d'inhibiteur. Un schéma résumant l'immobilisation sur les différents supports ainsi que le principe de détection est présenté dans la figure 14.

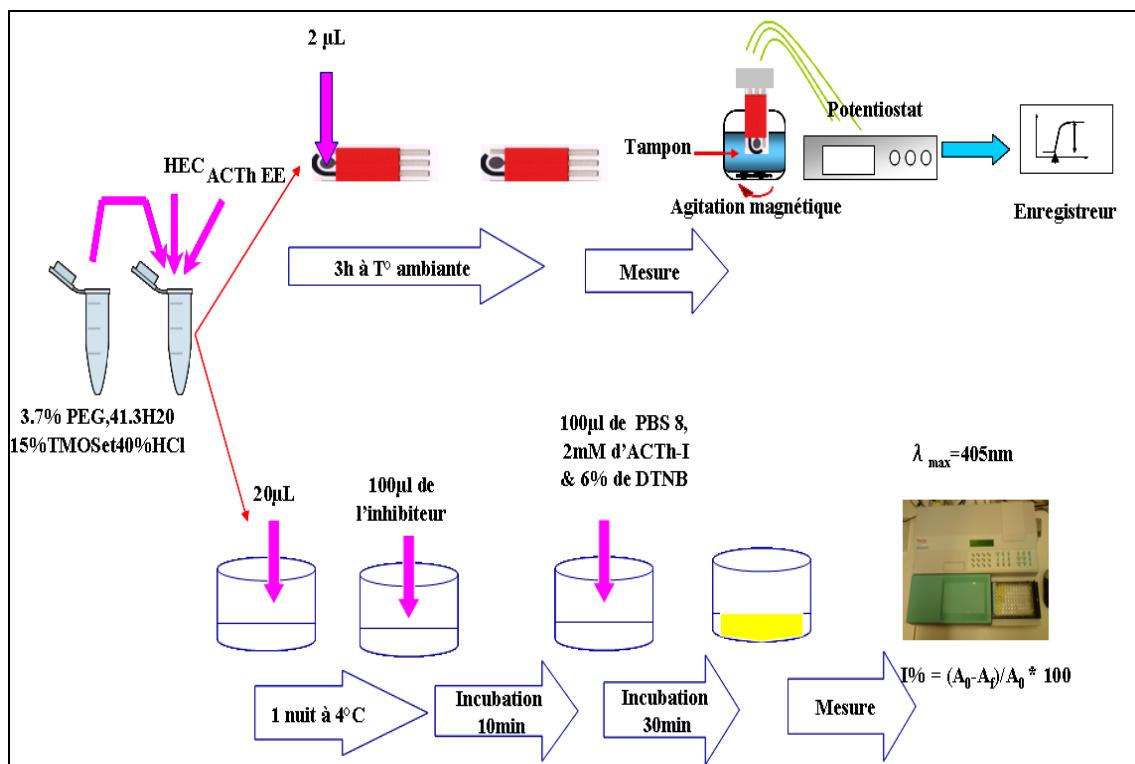


Figure 14 : Protocole d'immobilisation par la méthode sol-gel, principe de mesure de l'inhibition par les pesticides.

II. Matériels & méthodes

II.3.2.2. Immobilisation par liaisons covalentes sur des billes

magnétiques

L'immobilisation par couplage covalent, direct ou à l'aide d'un agent de réticulation tel que le glutaraldéhyde, est une technique très employée pour la fixation des enzymes à la surface de supports très divers, tels que les électrodes. Cette méthode assure une grande stabilité de l'enzyme et un temps de réponse très court du capteur. En revanche, la toxicité des agents de couplage pour l'enzyme, la faible reproductibilité et la complexité du procédé sont des inconvénients de cette méthode.

L'utilisation de particules (ou billes) magnétiques pour la conception de biocapteurs est en constante évolution depuis quelques années (Guedri, 2010). Ces supports permettent l'immobilisation covalente du biorécepteur et peuvent être facilement fixées au transducteur par simple application d'un champ magnétique. L'utilisation des billes magnétiques pour la fixation d'enzymes permet également d'augmenter la surface active et par conséquent d'augmenter la sensibilité.

Dans ce travail, nous avons testé l'immobilisation de l'acétylcholinestérase par des liaisons covalentes sur des billes magnétiques activées par des groupements amine (NH_2), en utilisant le glutaraldéhyde comme agent de réticulation. Le couplage s'effectue entre un groupement carbonyle actif et des groupements NH_2 générés à la surface des billes magnétiques (formation de bases de Schiff) (Andreeescu, 2002). Les différentes étapes de l'immobilisation sont les suivantes (Rossi *et al.*, 2004) :

(1) Oxydation des billes : 60 mg de billes magnétiques dans 1 mL d'acide sulfurique 0,5 M sont agitées pendant 4 h, puis lavées deux fois avec de l'eau distillée en large excès.

II. Matériels & méthodes

(2) Fonctionnalisation avec un groupement amine : resuspension des billes oxydées dans 100 mL d'éthanol dans un bac à ultrasons, ajout de 70 µL de 3-(amino-propyl triéthoxysilane) sous agitation mécanique pendant une nuit, puis lavage 3 fois à l'éthanol et 2 fois à l'eau distillée.

(3) Couplage covalent au glutaraldéhyde: 30 µL de suspension de billes sont lavés deux fois avec 1 mL de tampon phosphate 0,1 M à pH 7. Elles sont ensuite reprises avec 820 µL de tampon, 100 µL de solution d'AChE (4,41 UI/mL) et 80 µL de glutaraldéhyde à 25 %. Les billes sont maintenues sous agitation pendant 30 min à température ambiante.

Le protocole d'immobilisation des billes magnétiques activées avec l'enzyme, varie en fonction du type de support utilisé (figure 15) :

- Electrodes (détection ampérométrique) : 1 µL de suspension de billes activées est déposé à la micropipette à la surface de l'électrode de travail, préalablement munie à sa base d'un aimant de 4 mm de diamètre. Les mesures ampérométriques peuvent se faire directement après immobilisation, comme décrit par la suite (§ II.3.3.1).
- Microplaques (détection optique) : dans chaque puits sont introduits 200 µL de tampon phosphate pH 8, et 1 µL de billes préactivées par l'enzyme, puis le liquide surnageant est ensuite enlevé par retournement, la microplaquette étant équipée d'un support magnétique Adem-Mag 96 (Barthelmebs *et al.*, 2011). La mesure de l'activité enzymatique est réalisée en ajoutant dans chaque puits 200 µL d'un mélange d'ACTh-I à 2 mM et de DTNB (6 %) dans le tampon phosphate à pH 8. Après 30 min d'incubation, la mesure d'absorbance à 405 nm est réalisée à partir d'un volume de 100 µL prélevé de chaque puits et transféré sur une nouvelle plaque, pour éviter la présence des billes magnétiques interférant avec la mesure optique. L'inhibition par

II. Matériels & méthodes

les pesticides est mesurée par la même méthode, après une incubation pendant 10 minutes en présence de 100 µL d'inhibiteur.

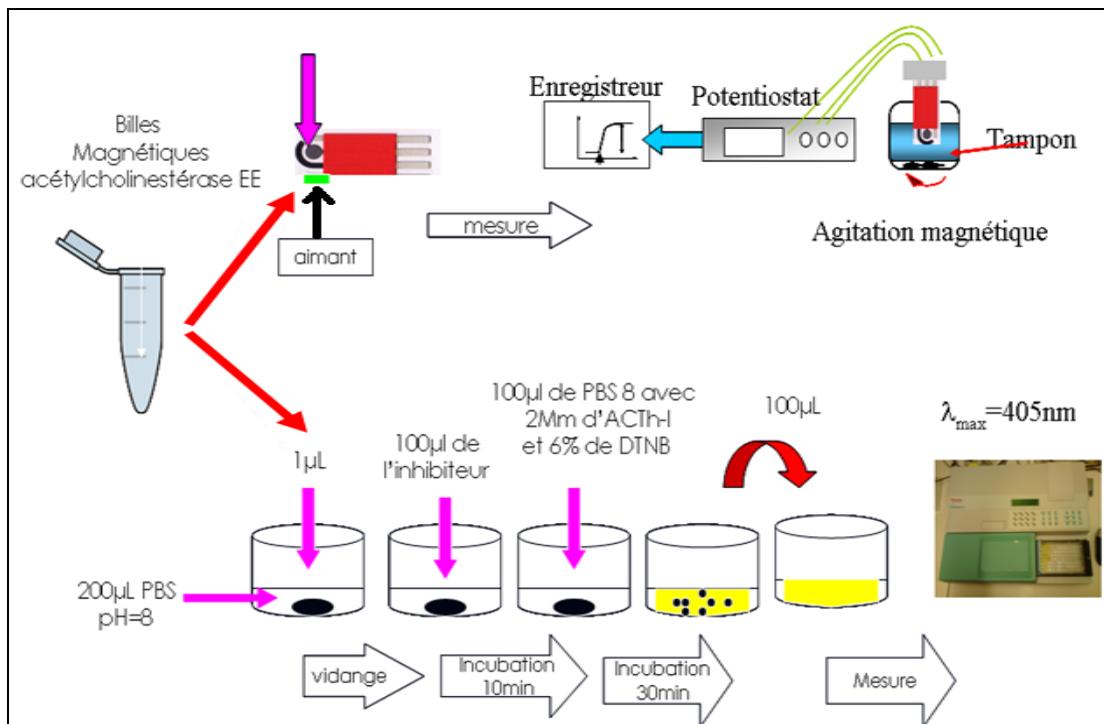


Figure 15 : Protocole d'immobilisation par liaison covalente sur des billes magnétiques, principe de mesure de l'inhibition par les pesticides.

II.3.2.3. Immobilisation par adsorption

Parmi les méthodes physiques d'immobilisation des enzymes, l'adsorption est une technique particulièrement simple, rapide et non destructive. Elle est basée sur l'adsorption physique ou par liaison ionique, ou les deux, sur la surface d'un support (Taylor, 1991). Les forces impliquées dans cette méthode sont des liaisons de faible énergie de type Van der Waals, hydrogène et ionique. Malheureusement, cette technique présente un certain nombre d'inconvénients tels que l'instabilité du biocapteur due à la désorption de l'enzyme, la

II. Matériels & méthodes

sensibilité aux variations de pH, de température et de force ionique, ainsi que la quantité d'enzyme à immobiliser qui est généralement importante et difficile à contrôler.

Dans ce travail, l'enzyme a été immobilisée sur des plaques de type MaxiSorpTM (Nunc, Roskilde, Danemark), qui présentent une très bonne capacité d'adsorption. Afin d'optimiser la quantité d'enzyme convenable à l'immobilisation, plusieurs solutions enzymatiques ont été testées, montrant des résultats optimum lorsqu'une solution d'AChE à 3 mUI/mL est utilisée.

Le temps de contact entre la solution enzymatique et la microplaqué a été également testé en mesurant l'activité après plusieurs intervalles de temps d'incubation, il est apparu que la fixation de l'enzyme dans le puits est optimale après 12 h d'incubation.

Après optimisation des différents paramètres, le protocole d'immobilisation utilisé est le suivant : 100 µL d'une solution d'AChE à 3 mUI/mL préparée dans un tampon carbonate à pH 9 sont déposés dans chaque puits. Après 12 h d'incubation, l'excès de solution est éliminé et les puits sont lavés avec du tampon phosphate à pH 8. La mesure de l'activité enzymatique est effectuée après ajout dans chaque puits de 200 µL d'un mélange contenant 2 mM d'ATCh-I et 6 % de DTNB dans le tampon à pH 8. Après 10 min d'incubation, l'absorbance est mesurée à 405 nm à l'aide d'un lecteur de microplaqué (figure 16). L'inhibition par les pesticides est mesurée par la même méthode, après une incubation pendant 10 min en présence de 100 µL d'inhibiteur en solution dans un tampon carbonate à pH 9.

II. Matériels & méthodes

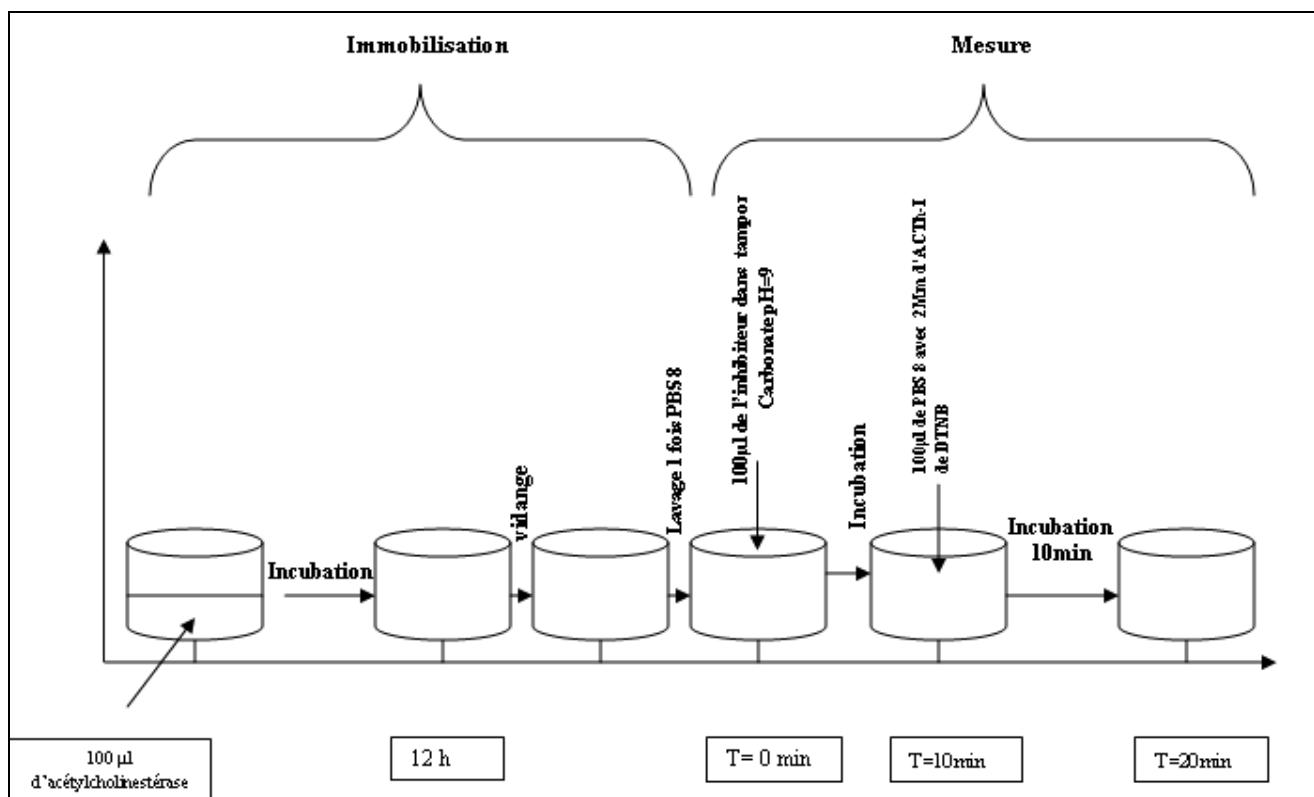


Figure 16 : Protocole d'immobilisation par adsorption sur microplaques et principe de mesure de l'inhibition par les pesticides.

II.3.3. Méthodes de détection

II.3.3.1 Méthode ampérométrique

La détection ampérométrique a été réalisée à l'aide de biocapteurs élaborés à partir d'électrodes sérigraphiées (SPE) fabriquées au sein du laboratoire IMAGES.

a. Fabrication des électrodes sérigraphiées

La technique développée est décrite dans la thèse de G. Istamboulie (2009). Elle consiste à déposer des pâtes conductrices (ou émulsions) en différentes couches sur un support solide en PVC transparent, à l'aide d'une machine à sérigraphier semi-automatique (figure 17).

II. Matériaux & méthodes

L'impression est réalisée en faisant passer l'émulsion à l'aide d'une raclette à travers les mailles de dimensions déterminées d'un tamis synthétique (polyester) ou métallique (acier inoxydable). La pâte pénètre par ces mailles et est déposée uniformément sur le support placé sur la table mobile de la machine.

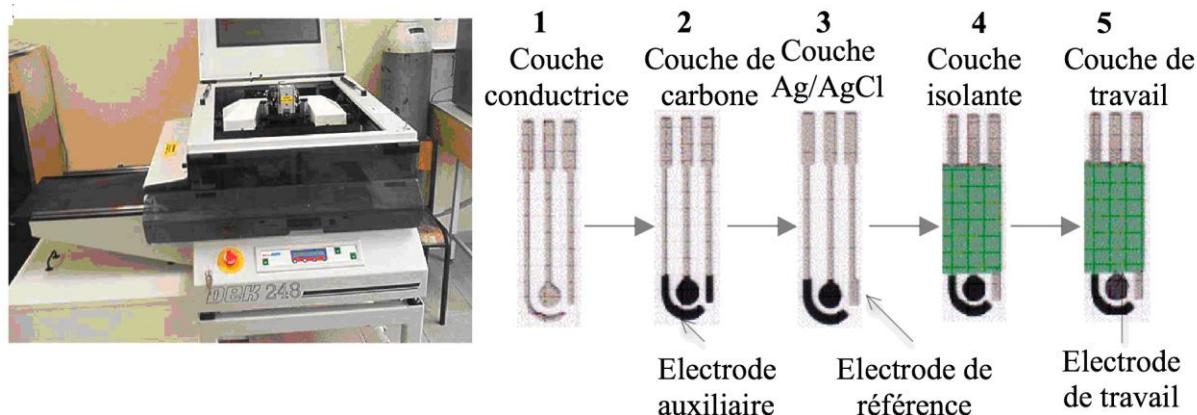


Figure 17 : Machine à sérigraphier DEK 248 (à gauche) et étapes de fabrication des électrodes par sérigraphie (à droite).

Les biocapteurs utilisés dans cette étude sont constitués d'un système à trois électrodes : une électrode de référence (Ag/AgCl), une électrode de travail et une électrode auxiliaire en pâte de carbone. Les différentes étapes de fabrication sont les suivantes (figure 17) :

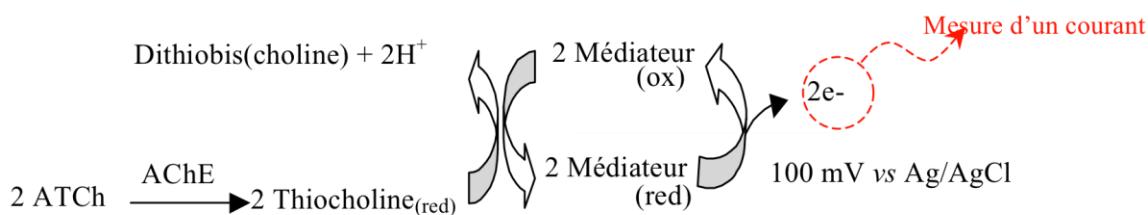
- Dépôt d'une pâte de carbone qui couvre la partie inférieure des électrodes et permet une meilleure adhésion des couches suivantes,
- Dépôt de la pâte de Ag/AgCl sur l'emplacement de l'électrode de référence,
- Dépôt d'une couche isolante entre les électrodes et les contacts.
- Dépôt sur l'électrode de travail d'une pâte de carbone contenant un médiateur (Co-Pc).

Après chaque étape, les électrodes sont séchées à l'étuve à 60°C pendant 30 min.

II. Matériels & méthodes

b. Détection ampérométrique des insecticides organophosphorés

L'activité de l'enzyme immobilisée ainsi que les mesures d'inhibition ont été réalisées par des mesures ampérométriques en solution agitée. L'électrode contenant l'enzyme immobilisée est immergée verticalement dans une cellule contenant 10 mL de tampon phosphate pH 7 dont la température est régulée à 30° C, sous agitation magnétique constante. Le potentiel appliqué est de 100 mV par rapport à l'électrode de pseudo-référence Ag/AgCl. Ce potentiel correspond au potentiel d'oxydation du médiateur choisi dans cette étude : le cobalt phtalocyanine. Le principe de détection est le suivant :



L'intensité du courant est enregistrée en fonction du temps. Après stabilisation du signal de base, le substrat ATCh est ajouté à une concentration finale de 1 mM dans la cellule. Ce substrat est transformé par l'AChE en thiocholine qui se dimérisé par une réaction d'oxydoréduction avec le médiateur (cobalt phtalocyanine _{ox}). Ce médiateur, une fois réduit, est réoxydé à un potentiel de 100 mV vs Ag/AgCl, générant un courant électrique mesurable. Le signal mesuré correspond à la différence d'intensité du courant entre la ligne de base et le signal final (plateau). La cellule est lavée avec de l'eau distillée entre chaque mesure. Le montage utilisé pour les mesures ampérométriques est présenté dans la figure 18.

II. Matériels & méthodes

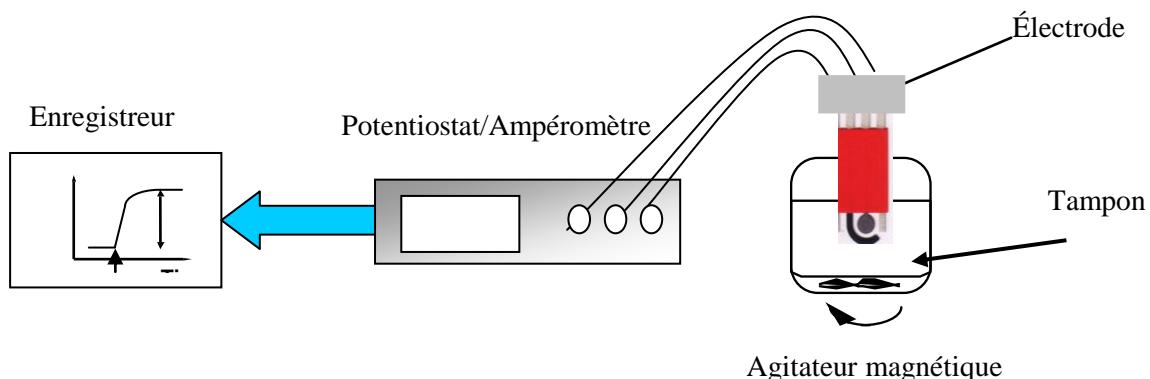


Figure 18 : Représentation du montage utilisé pour les mesures ampérométriques

Contrairement à la majorité des capteurs décrits dans la littérature, les capteurs à acétylcholinestérase ne sont pas basés sur le dosage du substrat de l'enzyme mais sur des mesures d'inhibition de celle-ci. La détection de l'inhibition par les pesticides est déterminée selon une procédure en trois étapes comme suit :

- (1) La réponse initiale du biocapteur (I_0) est mesurée en présence d'une concentration saturante de substrat (1 mM ATCh),
- (2) Le biocapteur est incubé dans une solution de pesticide de concentration connue pendant 10 min,
- (3) La réponse finale I_f est mesurée en présence de la même concentration saturante de substrat (figure 19). La diminution de la réponse du capteur est due à l'inhibition partielle ou totale de l'enzyme par l'inhibiteur. Le taux d'inhibition dépend de la concentration en inhibiteur, il est calculé selon la formule :

$$I (\%) = [(I_0 - I_f) / I_0] \times 100$$

II. Matériels & méthodes

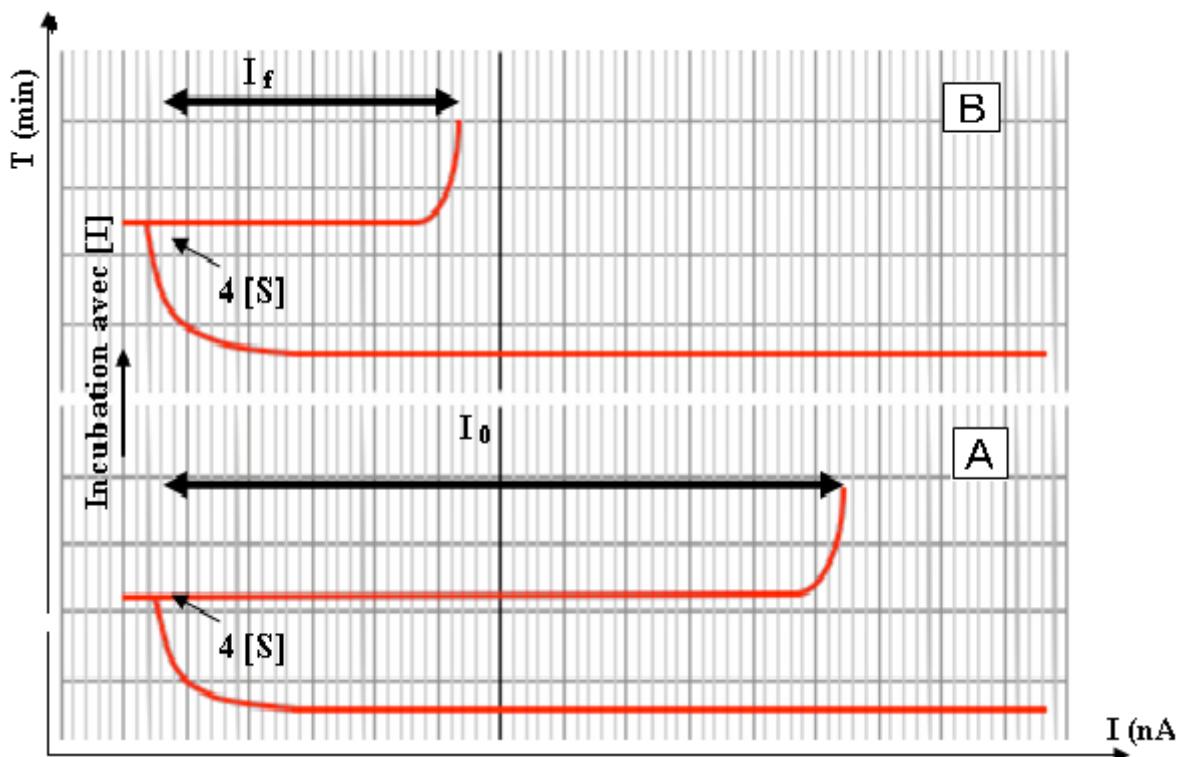


Figure 19 : Détection ampérométrique des insecticides organophosphorés A: mesure de la réponse initiale du capteur (3 à 5 essais successifs), B: mesure de la réponse après incubation dans une solution d'inhibiteur de concentration connue.

Les études d'inhibition ont été réalisées en présence de concentrations connues des trois OPs utilisés au cours de cette étude : le malaoxon, l'ométhoate et le méthidathion oxydé. Les limites de détection ont été définies dans ce travail comme les concentrations de pesticides induisant une diminution de 10 % de la réponse du capteur, la variation de réponse pour un même capteur étant inférieure à 2 % ($n=5$).

II.3.3.2. Détection optique

Ce travail a été réalisé avec des plaques de microtitration à 96 trous (MaxiSorp™ dans le cas de l'immobilisation par adsorption), permettant de traiter un grand nombre d'échantillons simultanément. L'activité enzymatique est mesurée par spectrophotométrie d'absorption

II. Matériels & méthodes

moléculaire à l'aide d'un lecteur de plaque Labsystems Multiskan associé à un logiciel approprié. Le principe de mesure est fondé sur la méthode d'Ellman (Ellman *et al.*, 1961), basée sur la détection à 405 nm d'un composé de coloration jaune (5-thio-2-nitrobenzoate) issu de l'interaction entre la thiocholine et le DTNB (figure 20).

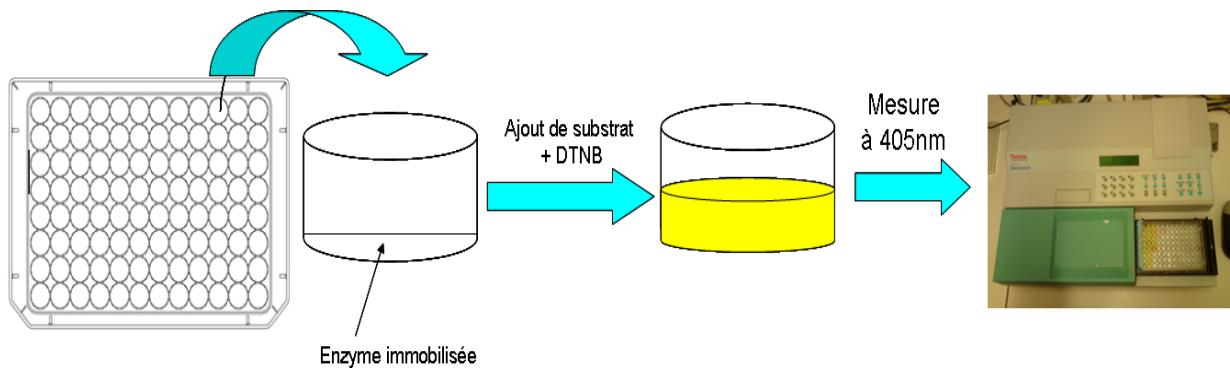


Figure 20: Principe de mesure colorimétrique des activités enzymatiques.

Les protocoles d'immobilisation ainsi que de détection colorimétrique pour les trois méthodes sont présentés ci-dessous, séparément, dans la partie concernant chaque méthode.

II.3.4. Oxydation des pesticides

La plupart des organophosphorés disponibles sur le marché sont des phosphorothionates, caractérisés par un groupement thione ($P=S$) et trois groupes $O-R$ liés à un atome de phosphore. Leurs analogues oxydés sont plus polaires, et caractérisés par une liaison ($P=O$) (Bavcon Kralj *et al.*, 2006). La forme $P=O$ d'un organophosphoré est définie comme sa forme oxon, terme souvent incorporé dans son nom usuel (ex : malathion / malaoxon). Ces formes sont le plus souvent moins stables mais très toxiques car elles possèdent une structure propice à inhiber fortement l'AChE des différents organismes contaminés (Ménager, 2007). En effet

II. Matériaux & méthodes

une forme oxon ($P=O$) possède un potentiel phosphorylant de l'acétylcholinestérase bien plus important qu'une forme $P=S$ (Floesser-Mueller et Swack, 2001). Par exemple, le malaoxon est un inhibiteur de l'AChE 1000 fois plus fort, et 80 fois plus毒ique chez le rat que le malathion (malaoxon : $DL_{50}=158$ mg/kg : malathion : $DL_{50}=12500$ mg /kg) (Ryan et Fukuto, 1985 ; Umetsu *et al.*, 1977). L'oxydation des organophosphorés peut être réalisée par l'intermédiaire d'agents chimico-physiques ou par métabolisation. Ainsi, pour être actifs, les organophosphorés contenant un groupement thiophosphoryle ($P=S$) sont transformés par bioactivation en leur forme oxon ($P=O$) par la monooxygénases chez les insectes (Cohen, 1984).

Dans cette étude, nous nous sommes concentrés sur la détection des formes oxydées des trois pesticides étudiés : malathion, dimethoate et méthidathion. Les formes oxydées du diméthoate et du malathion, appelées respectivement ométhoate et malaoxon sont disponibles sur le marché. Ce n'est pas le cas pour le méthidathion, dont l'oxydation a été réalisée par l'intermédiaire d'un agent oxydant : le N-bromosuccinimide (NBS) (figure 21) (Bavcon Kralj *et al.*, 2006).

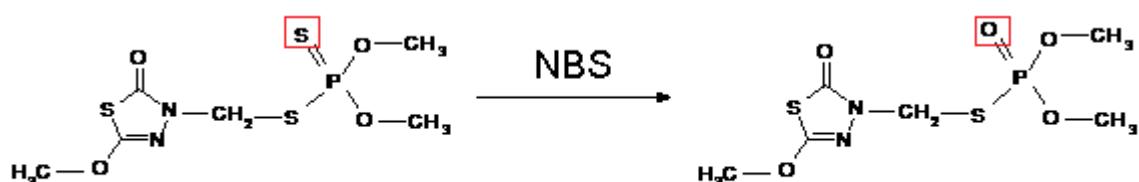


Figure 21 : Oxydation du méthidathion par le N-bromosuccinimide (NBS).

L'efficacité de cette étape d'oxydation a été contrôlée par analyse en HPLC en phase inverse. Il a été démontré qu'une concentration de 3.10^{-5} M de NBS était suffisante pour l'oxydation totale d'une solution de méthidathion à 10^{-5} M. Dans ce travail, afin de s'assurer de l'oxydation totale du pesticide, cette étape a été effectuée en utilisant 5 molécules de NBS par

II. Matériels & méthodes

molécule de pesticide. La solution de pesticide oxydé ainsi obtenue a été utilisée comme solution mère de méthidathion. Toutes les autres solutions ont été obtenues par dilution de celle-ci.

L'effet du NBS sur l'AChE a été étudié afin de s'assurer que l'enzyme n'est pas affectée par l'agent oxydant. Il a été démontré que, dans les conditions de travail, le NBS ne provoque aucune inhibition de l'acétylcholinestérase utilisée.

II.3.5. Application sur les échantillons naturels

L'huile d'olive est une matrice complexe de très grande importance économique, et peu étudiée en ce qui concerne la détection de pesticides. Le but de notre travail étant la détection de trois organophosphorés dans l'huile d'olive par des méthodes enzymatiques (biocapteur), des tests ont été effectués en utilisant des échantillons naturels d'huile d'olive auxquels ont été ajoutés les pesticides étudiés. Les méthodes d'extraction des pesticides de la matière grasse, décrites dans les normes européennes (CEN), sont longues et utilisatrices de quantités notables de divers consommables. Dans ce travail, l'extraction des pesticides de l'huile a été réalisée dans un premier temps par une simple extraction liquide-liquide, puis par extraction solide-liquide en utilisant des polymères à empreinte moléculaire (MIPs).

II.3.5.1. Extraction liquide-liquide

Afin d'évaluer la viabilité des biocapteurs développés, ces derniers ont été testés pour la détection des trois organophosphorés étudiés dans des échantillons naturels d'huile d'olive. La détection dans le produit naturel a été réalisée après un simple procédé d'extraction liquide-liquide dont le protocole est le suivant: 10 mL d'huile d'olive extra vierge « bio »

II. Matériels & méthodes

achetée dans un supermarché local ont été dopés avec des concentrations connue de chaque pesticide préparé dans l'hexane. Le mélange a été chauffé à 50 °C pendant 30 min, et 500 µL de cette huile d'olive a été ajouté à 400 µL d'acétonitrile et 100 µL de dichlorométhane. Le mélange a été ensuite centrifugé à 13400 rpm pendant 90 s, et le surnageant résultant a été récupéré et utilisé en tant que solution mère de pesticide. Les autres solutions ont été préparées par dilution de cette solution mère. La viabilité de cette technique d'extraction a été contrôlée par des tests chromatographiques (HPLC-UV), montrant une bonne efficacité de celle-ci avec un rendement variant entre 80 et 100 %.

II.3.5.2. Extraction par polymères à empreinte moléculaire

L'association d'un MIP spécifique et sélectif à un dispositif de détection permet la reconnaissance sélective d'une entité donnée (Elisabeth, 2008). Les MIPs utilisés au cours de cette étude sont le résultat d'une thèse complémentaire qui entre dans le cadre du même projet que celle-ci, et ont été spécialement conçus pour les trois pesticides cibles étudiés. Un extrait de la méthode de préparation de ces MIPs est mentionné ci-dessous :

La molécule cible de pesticide, différents monomères ainsi que l'initiateur de radicaux azo-N,N'-bisobutyronitrile (AIBN) sont placés dans des flacons et dissous dans un faible volume de solvant. Les solutions sont alors dégazées quelques instants aux ultrasons puis placées 10 minutes sous un flux d'azote. Les flacons sont ensuite fermés hermétiquement et disposés dans un bain d'huile à 80°C pendant une nuit. Les polymères sont alors broyés et tamisés afin d'obtenir des particules de granulométrie comprise entre 45 et 100 µm, puis correctement lavés au Soxhlet avec un mélange méthanol/acide acétique (90/10) pendant 8 heures.

II. Matériels & méthodes

L'extraction des pesticides de l'huile d'olive par les MIPs a été réalisée selon le protocole suivant :

- ❖ Préparation des échantillons : 10 mL d'huile d'olive dopée par une concentration connue de pesticides sont mis sous agitation pendant 30 min à 45°C, puis 1 mL de cette huile est dilué dans 9 mL d'hexane.
- ❖ Extraction solide-liquide : la cartouche de MIPs préparée est conditionnée avec 5 mL d'hexane puis l'échantillon préparé est déposé. La colonne est ensuite lavée avec 5 mL d'une solution d'hexane/dichlorométhane 20% puis éluée avec 1 mL de méthanol. Les pesticides récupérés dans le méthanol sont ensuite évaporés à sec puis récupérés dans 10 mL de tampon phosphate à pH 7. Pour s'assurer de la récupération des pesticides dans le tampon après évaporation, un contrôle par HPLC en phase inverse a été effectué, montrant un rendement de récupération de 100%.

La solution de pesticide obtenue est ensuite directement mise à incuber avec le biocapteur ampérométrique comme décrit auparavant (§II.3.3.1).

III. Résultats et discussion

Résultats & discussion

III. RESULTATS ET DISCUSSION

Le but de notre travail a été de développer des outils de détection sensibles et sélectifs pour la détection des trois organophosphorés mis en jeu : le malathion, le diméthoate et le méthidathion, sous leurs formes oxydées (-oxon). Pour arriver à notre objectif plusieurs systèmes ont été développés au cours de cette étude, afin de choisir le plus performant qui sera ensuite optimisé, et dont la sélectivité sera améliorée en l'associant à une nouvelle technique d'extraction : les MIPs. Les dispositifs analytiques développés ont été obtenus par la combinaison de 3 méthodes d'immobilisation et 2 méthodes de détection différentes. Les performances analytiques de ces outils ainsi que les résultats obtenus après leurs applications sur des solutions standards et des échantillons naturels d'huile d'olive sont présentés dans ce 3^{ème} chapitre.

Avant d'entamer la présentation des résultats, quelques notions concernant les qualités des capteurs doivent être définies (Fabry, 2003):

Reproductibilité (reproductibility) :

Ce paramètre est probablement le plus important, tant pour les capteurs physiques que chimiques. Il s'agit de l'aptitude d'un capteur à donner, dans des conditions définies, des réponses très voisines lors de l'application répétée d'un même signal d'entrée.

Sensibilité (sensitivity) :

Ce paramètre caractérise l'aptitude du capteur à détecter la plus petite variation de la grandeur à mesurer. Il est calculé par le quotient de l'accroissement de la réponse d'un instrument de mesure par l'accroissement correspondant du signal d'entrée. Dans le cas des capteurs

III. Résultats et discussion

ampérométriques, cette grandeur est le rapport d'une intensité sur une concentration, exprimé en A.mol.L⁻¹. Elle est principalement utilisée pour la détection de substrats d'enzymes.

Sélectivité (selectivity) :

C'est la capacité du capteur à ne mesurer qu'une seule grandeur dans le milieu où il est utilisé ou en d'autres termes, d'être le plus insensible aux grandeurs d'influence, grandeurs qui ne font pas l'objet de la mesure, mais influent sur le signal de sortie du capteur.

Limite de détection (detection limit) :

C'est la plus petite valeur de la grandeur à mesurer pouvant être détectée, avec une incertitude acceptable, et qui se distingue significativement du bruit de fond. Dans ce travail, cette valeur est définie comme la concentration de pesticide induisant 10 % d'inhibition.

III.1. Caractérisation de l'acétylcholinesterase mise en jeu

Dans ce travail nous avons utilisé exclusivement l'acétylcholinestérase (AChE) d'anguille électrique. Avant de passer au développement et à l'optimisation des biocapteurs, une étude préliminaire pour caractériser l'enzyme en solution a été menée, il s'agit de la détermination des paramètres cinétiques, de la stabilité opérationnelle de l'enzyme et de la constante d'inhibition k_i , indice de sensibilité de cette enzyme vis-à-vis des trois pesticides mis en jeu.

III.1.1. Détermination des paramètres cinétiques

Les deux paramètres importants d'une cinétique enzymatique sont la constante de Michaelis-Menten (K_m) et la vitesse maximale (V_m). Ils ont été déterminés selon la méthode d'Ellman, par des mesures spectrophotométriques à 412 nm. Les résultats obtenus sont présentés dans les figures 22 (représentation de Michaelis-Menten) et 23 (représentation de Lineweaver et Burk). Les K_m et V_m ont été déterminés en utilisant la représentation en doubles inverses de Lineweaver et Burk. L'équation de la droite ainsi obtenue permet la détermination des valeurs des paramètres cinétiques de l'enzyme qui sont de l'ordre de $V_m = 0,00451 \text{ mM/min}$ et $K_m = 0,05 \text{ mM}$. Cette valeur de K_m est conforme aux résultats déjà décrits par Martorell et al. (1996), selon lesquels le K_m pour l'AChE-ee libre varie entre 0.05 et 0.2 mM.

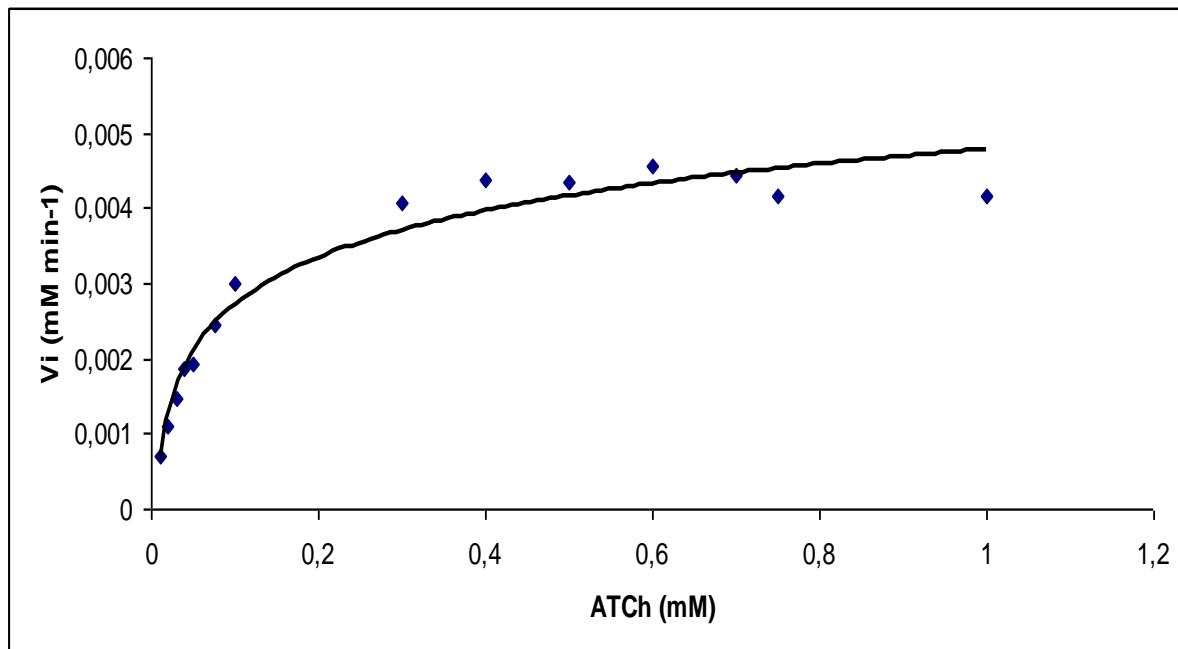


Figure 22 : Représentation de Michaelis-Menten.

III. Résultats et discussion

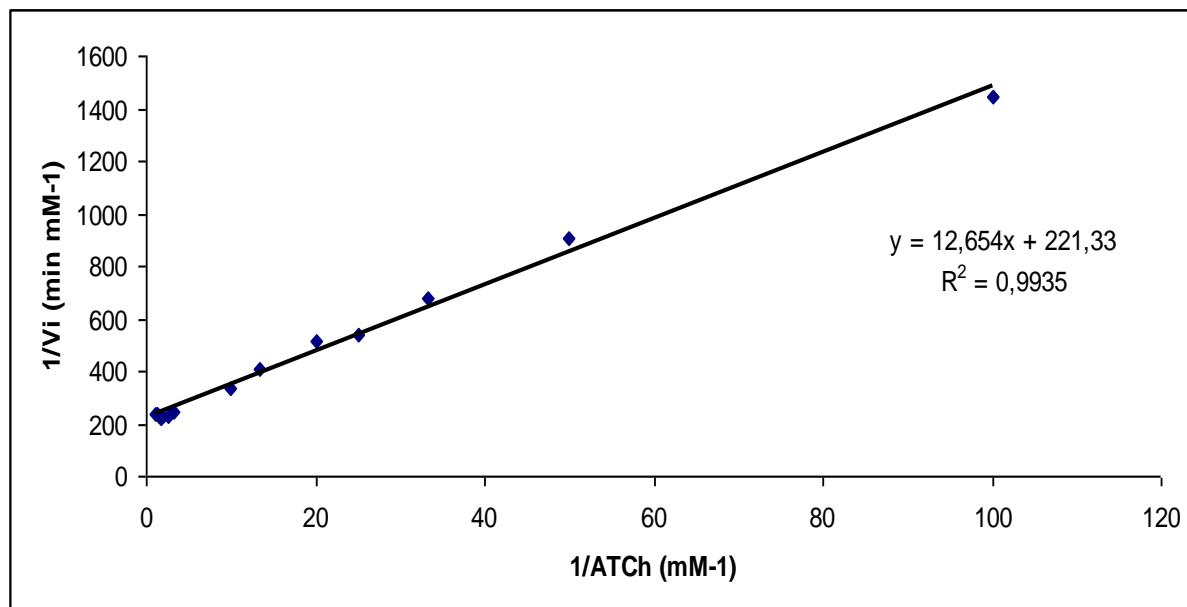


Figure 23: Représentation de Lineweaver-Burk.

III.1.2. Etude de la stabilité de l'enzyme

La stabilité d'un biocapteur dépend essentiellement de la stabilité de l'élément biologique : l'enzyme, dont l'activité varie en fonction du temps et de la température. Il est donc important de déterminer la stabilité des enzymes en solution avant leur utilisation pour la fabrication des biocapteurs (Andreescu, 2002). La stabilité de l'acétylcholinestérase d'anguille électrique utilisée dans cette étude a été déterminée en mesurant à des intervalles de temps réguliers l'activité d'une solution enzymatique préparée dans un tampon phosphate à pH 7 contenant 0,1 % d'albumine, et conservé à 4°C, en présence d'une concentration saturante de substrat. Les résultats obtenus montrent une grande stabilité de l'acétylcholinestérase, aucune perte d'activité n'étant observée même après 2 mois de stockage à 4°C.

III. Résultats et discussion

III.1.3. Constantes d'inhibition

La constante d'inhibition k_i est un paramètre fondamental pour comparer le pouvoir inhibiteur des insecticides. Un k_i élevé indique une forte affinité du pesticide pour l'enzyme et donc un pouvoir inhibiteur important (Istamboulie, 2009). Les valeurs de k_i sont déterminées en étudiant l'activité résiduelle de l'enzyme après contact avec différentes concentrations d'inhibiteur pendant un temps d'incubation donné. La représentation du log de l'activité résiduelle en fonction du temps de pré-incubation permet de déterminer le k_{obs} , puis la représentation de l'inverse de k_{obs} en fonction de l'inverse de la concentration d'inhibiteur permet de calculer le k_i .

Les constantes d'inhibition nous permettront d'évaluer la sensibilité de l'enzyme vis-à-vis des pesticides concernés par cette étude. Les courbes obtenues pour ces trois pesticides étudiés : méthidathion oxydé, malaoxon, et ométhoate sont représentées dans les figures 24, 25 et 26.

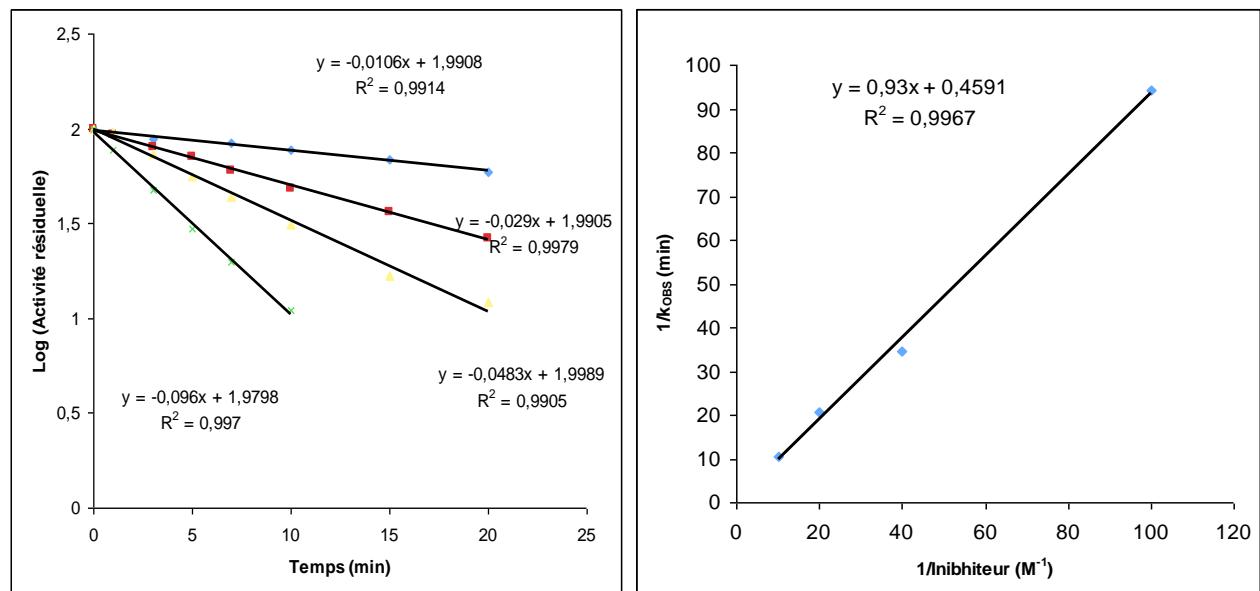


Figure 24 : Détermination de k_{obs} et k_i pour le méthidathion oxydé.

III. Résultats et discussion

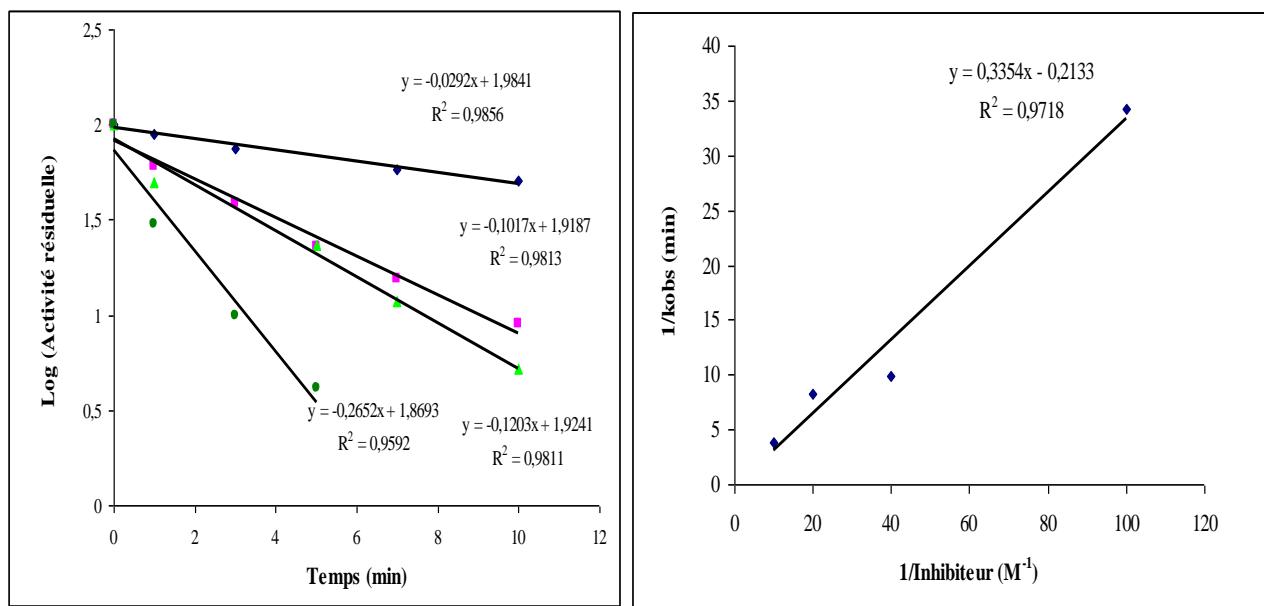


Figure 25 : Détermination de k_{obs} et k_i pour le malaoxon.

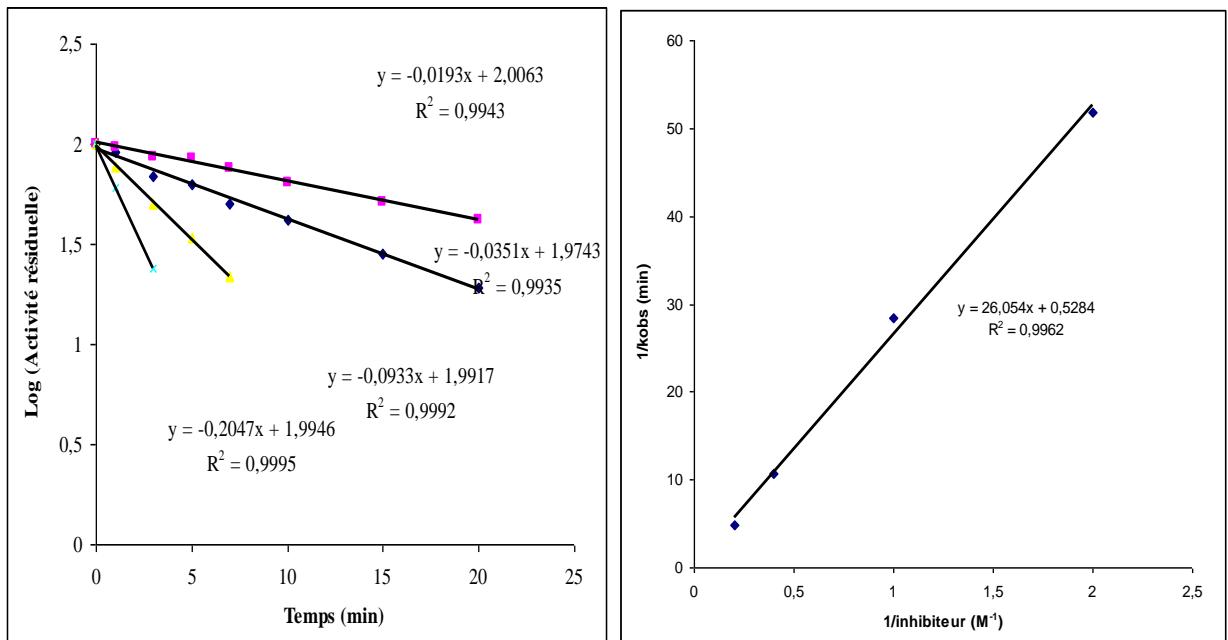


Figure 26 : Détermination de k_{obs} et k_i pour l'ométhoate.

III. Résultats et discussion

La pente de la droite représentant l'inverse de k_{obs} en fonction de l'inverse de la concentration en inhibiteur correspond à l'inverse de la constante d'inhibition k_i ($M^{-1} \cdot min^{-1}$). Les valeurs des k_i obtenues pour le malaoxon, méthidathion oxydé et ométhoate sont présentées dans le tableau 5.

Tableau 5 : Valeurs des k_i obtenus en ($\mu M^{-1} \cdot min^{-1}$) pour les trois pesticides étudiés

	Méthidathion	Malaoxon	Ométhoate
AChE-EE	1,07	2,98	0,01

Les résultats obtenus révèlent la faible sensibilité de l'acétylcholinestérase de l'anguille électrique vis-à-vis de l'ométhoate, contrairement au malaoxon et au méthidathion-oxon qui présente des constantes d'inhibition 100 et 200 fois plus élevées, indiquant un grand pouvoir inhibiteur.

III.2. Détection des insecticides organophosphorés par biocapteur ampérométrique

III.2.1. Oxydation du méthidathion

Comme décrit dans la partie matériels et méthodes (§ II.3.4), les pesticides utilisés dans cette étude sont sous leur forme oxydée (-oxon). L'ométhoate et le malaoxon, formes oxydées du diméthoate et du malathion, sont disponibles sur le marché, en revanche le méthidathion a dû être oxydé par l'intermédiaire d'un agent oxydant : le N-bromosuccinimide (NBS).

L'efficacité de l'oxydation du méthidathion a été contrôlée par chromatographie en phase inverse (CLHP-UV). Pour une concentration de méthidathion de 0,01 mM, des

III. Résultats et discussion

concentrations de NBS comprises entre de 0,01 mM à 0,05 mM ont été utilisées. Les résultats obtenus montrent qu'une concentration de 0,03 mM de NBS est suffisante pour l'oxydation du méthidathion (figure 27).

Dans ce travail, et afin de s'assurer de l'oxydation totale du pesticide, cette étape a été effectuée en utilisant 5 équivalents de NBS par équivalent de pesticide. Il a été préalablement vérifié que la concentration de NBS utilisée ne provoque aucune inhibition de l'enzyme utilisée et n'affecte pas les mesures. Des tests ampérométriques ont donc été réalisés après incubation du capteur à AChE avec des concentrations de NBS allant jusqu'à $7,5 \cdot 10^{-5}$ M, aucun effet du NBS n'a été observé. La solution de pesticide oxydé ainsi obtenue a été utilisée comme solution mère de méthidathion et toutes les autres solutions ont été obtenues par dilution de celle-ci.

III. Résultats et discussion

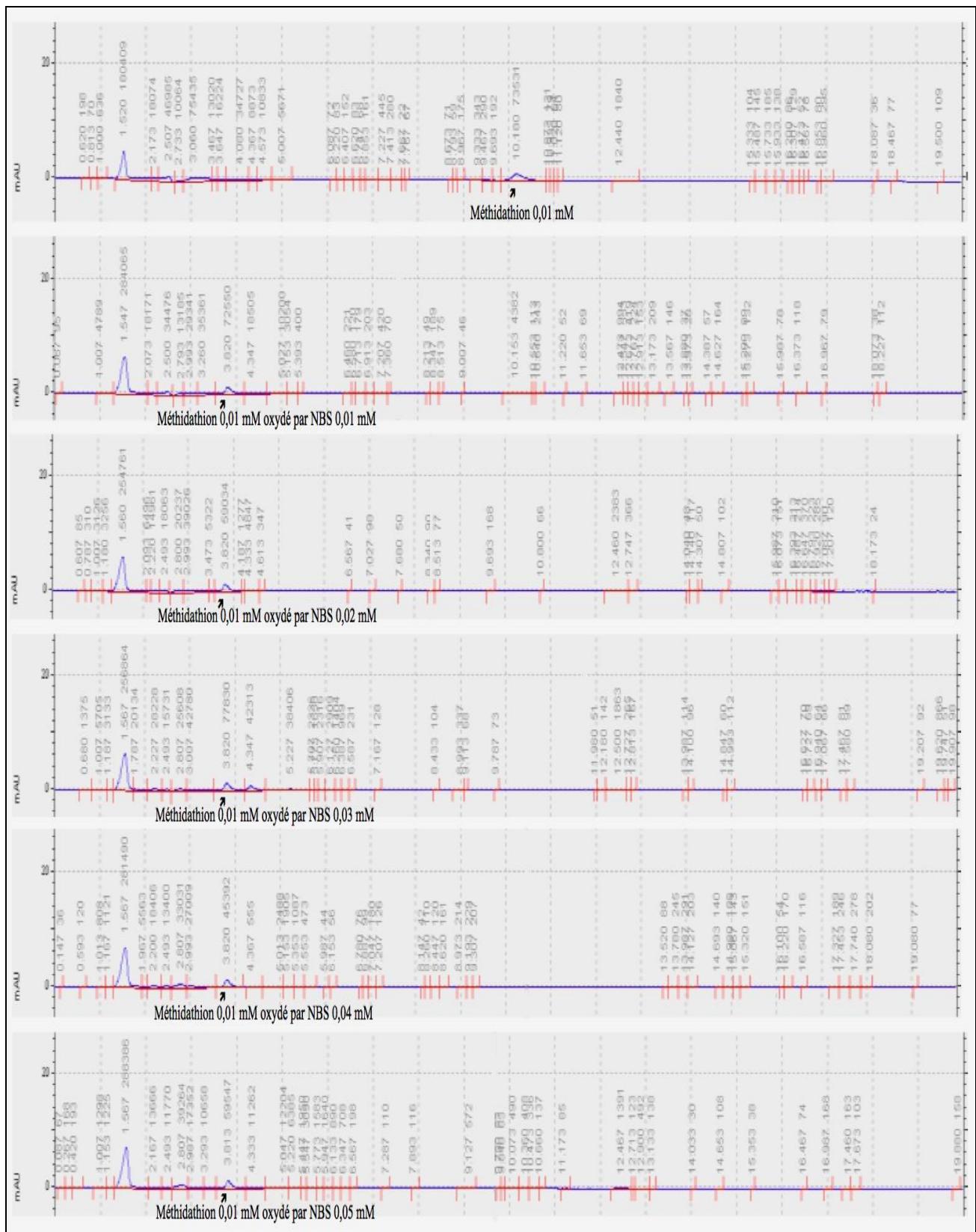


Figure 27 : Chromatogrammes obtenus après oxydation du méthidathion (0,01 mM) par le N-bromosuccinimide à des concentrations de 0,01, 0,02, 0,03, 0,04 et 0,05 mM.

III. Résultats et discussion

III.2.2. Effet de l'acétonitrile

La préparation des solutions mères de pesticides ainsi que leur extraction à partir des échantillons naturels d'huile d'olive ont été réalisées en utilisant l'acétonitrile comme solvant. L'influence de ce solvant organique sur les capteurs à acétylcholinestérase d'anguille électrique a été précédemment décrit par la littérature (Valdés-Ramírez *et al.*, 2008) : L'activité catalytique de l'AChE immobilisée sur des électrodes sérigraphiées (SPE) dans une matrice polymérique de PVA-AWP a été étudiée en mesurant la réponse du capteur après 10 minutes d'incubation dans un tampon phosphate contenant des proportions variables d'acétonitrile. Les résultats obtenus montrent que l'activité de l'AChE diminue significativement au delà de 10 % d'acétonitrile, alors que des concentrations allant de 1 à 5 % ne provoquent aucune diminution de l'activité enzymatique.

Nous avons vérifié dans ce travail qu'un pourcentage d'acétonitrile de 10 % n'a pas d'effet sur l'activité de l'AChE immobilisée, quel que soit le mode de détection utilisé (optique ou ampérométrique).

III.2.3. Méthodes d'immobilisation

Une partie importante de cette thèse a concerné la mise au point des méthodes d'immobilisation. Trois méthodes différentes ont été testées pour fixer l'enzyme à la surface des transducteurs : l'immobilisation par adsorption, l'immobilisation par liaisons covalentes sur des billes magnétiques et le piégeage dans une matrice sol-gel. Les capteurs étant basés sur deux méthodes de détection différentes, 5 types de dispositifs ont été obtenus : 3 optiques et 2 ampérométriques. L'activité enzymatique exprimée en unités internationales (UI) a été déterminée par des mesures spectrophotométriques avant chaque dépôt selon la méthode d'Ellman (Ellman *et al.*, 1961).

III. Résultats et discussion

A. Immobilisation par adsorption

La première technique mise en œuvre est l'immobilisation par adsorption sur des microplaques MaxiSorp. Dans cette partie 100 µL d'une solution d'AChE à 3 mUI/mL ont été immobilisés dans chaque puits, l'activité enzymatique ainsi que les tests d'inhibition ont été effectués par des mesures spectrophotométriques à 405 nm à l'aide d'un spectrophotomètre lecteur de microplaques.

1. Optimisation du temps de réaction

Avant de commencer les mesures, une étude a été réalisée afin d'optimiser le temps de réaction entre l'enzyme et le substrat. Dans les conditions de l'essai, l'absorbance du complexe coloré obtenu est maximale après un temps de réaction de 10 min, ce temps de réaction a donc été ensuite appliqué pour toutes les mesures.

2. Caractéristiques du capteur

Des études de reproductibilité ont été réalisées afin de s'assurer de la bonne fixation par adsorption de l'enzyme au fond des puits. Pour cela, les puits ont été lavés à 10 reprises avec 200 µL de tampon phosphate à pH 8, l'activité enzymatique étant contrôlée après chaque lavage. Les microplaques préparées montrent une bonne stabilité opérationnelle, leur réponse est stable jusqu'au 6^{ème} lavage puis une perte de plus de 50 % d'activité est observée lors du 7^{ème} lavage. Les dispositifs étant conçus pour un usage unique, la stabilité des plaques est satisfaisante pour des mesures d'inhibition de l'AChE.

La stabilité au stockage des plaques préparées a été également évaluée en mesurant l'activité enzymatique chaque jour pendant un mois. Les résultats obtenus montrent une bonne stabilité au stockage, 70 % d'activité étant conservée après 1 mois à 4°C.

III. Résultats et discussion

3. Détection des organophosphorés

Une fois tous les paramètres mis au point, la détection des insecticides a été réalisée en utilisant un temps d'incubation entre l'enzyme et l'inhibiteur de 10 min, pour des concentrations comprises entre $5 \cdot 10^{-9}$ M et $5 \cdot 10^{-6}$ M pour le malaoxon, 10^{-4} M et $2,5 \cdot 10^{-7}$ M pour l'ométhoate, et $5 \cdot 10^{-6}$ M et 10^{-8} M pour le méthidathion oxydé. Les taux d'inhibition obtenus pour chaque pesticide en fonction de la concentration d'insecticides sont présentés sur la figure 28, avec 5 répétitions minimum pour chaque concentration.

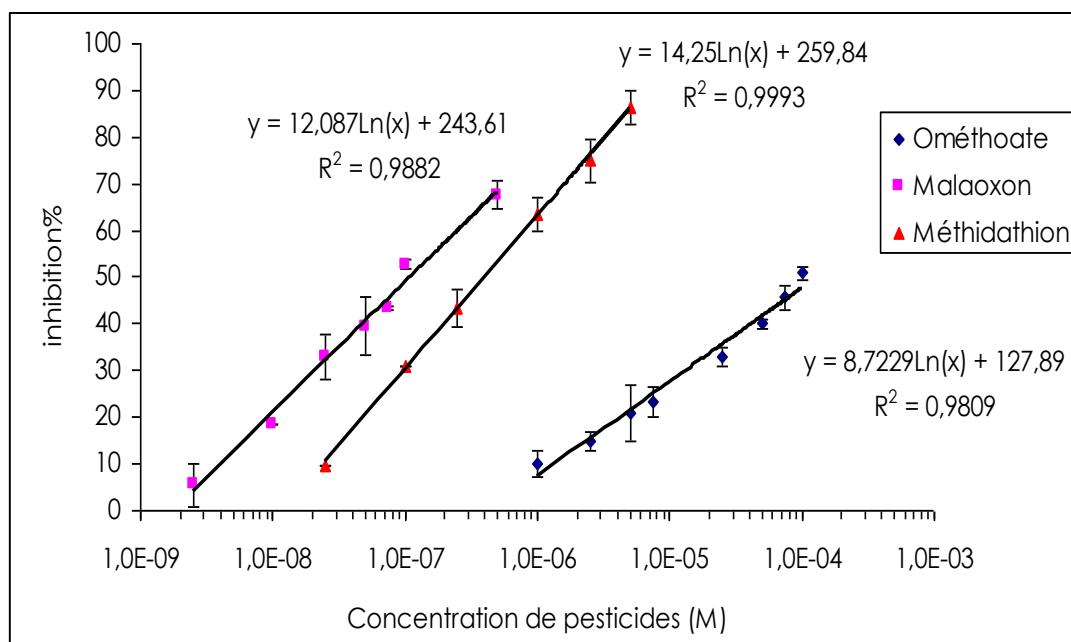


Figure 28 : Droites de calibration obtenues avec un capteur optique à AChE immobilisée par adsorption sur des microplaques.

Comme attendu, les résultats obtenus confirment que l'acétylcholinestérase d'anguille électrique est très sensible au malaoxon et au méthidathion, mais peu sensible à l'ométhoate. Il apparaît à partir des barres d'erreurs mentionnées sur la figure 28 que les biocapteurs développés présentent une faible reproductibilité de mesure. Ceci peut être expliqué par la difficulté de contrôler précisément la quantité d'enzyme effectivement immobilisée à

III. Résultats et discussion

l'intérieur des puits. Ce problème s'ajoute à la difficulté de maintenir une bonne reproductibilité en travaillant avec de très faibles volumes.

Les performances des dispositifs en microplaques pour la détection des pesticides étudiés sont résumées dans le tableau 6. IC₁₀ est la limite de détection, elle correspond à la concentration de pesticide provoquant 10 % d'inhibition, alors que IC₅₀ et IC₁₀₀ sont les concentrations provoquant respectivement 50 et 100 % d'inhibition. On constate que les systèmes développés présentent une bonne performance analytique avec des limites de détection acceptables, de l'ordre de 1,3.10⁻⁶ M pour l'ométhoate, 2,4.10⁻⁸ M pour le méthidathion et jusqu'à 4.10⁻⁹ M pour le malaoxon.

*Tableau 6 : Performances des tests en microplaques (immobilisation par adsorption) pour la détection du malaoxon, du méthidathion oxydé et de l'ométhoate
(IC=concentration inhibitrice, IC10=limite de détection)*

	IC ₁₀ (M)	IC ₅₀ (M)	IC ₁₀₀ (M)
Malaoxon	4,0.10 ⁻⁹	1,1.10 ⁻⁷	6,9.10 ⁻⁶
Méthidathion oxydé	2,4.10 ⁻⁸	4,0.10 ⁻⁷	1,3.10 ⁻⁵
Ométhoate	1,3.10 ⁻⁶	1,3.10 ⁻⁴	4,0.10 ⁻²

4. Application sur les échantillons naturels

Afin d'évaluer la viabilité des essais développés, des tests avec des échantillons naturels d'huile d'olive ont été réalisés. Un échantillon de 10 mL d'huile d'olive bio extra-vierge a été dopé avec des concentrations connues de pesticides, puis extrait par une simple méthode

III. Résultats et discussion

liquide-liquide comme décrit auparavant (§ II.3.5.1). Un témoin a été préparé avec de l'huile non dopée afin de s'assurer de l'absence d'interférences ou d'un autre insecticide dans l'huile d'olive. Il a été constaté que les échantillons non dopés ne présentent aucun effet d'inhibition, alors que ceux dopés présentent des degrés d'inhibition en bonne corrélation avec ceux obtenus avec des solutions standards de pesticides (figure 29), le taux de recouvrement variant entre 80 et 120 %.

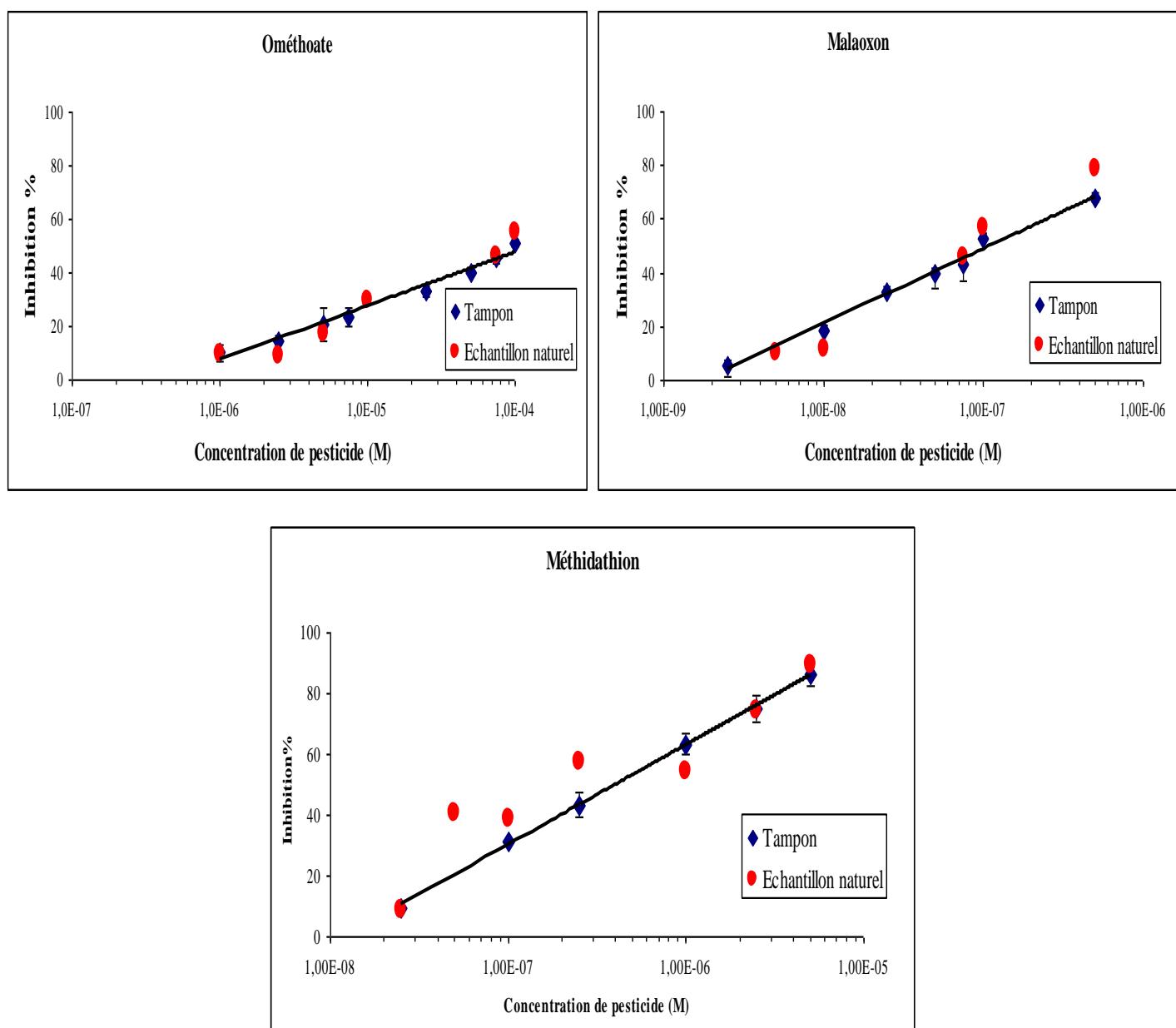


Figure 29 : Essais de détection des 3 insecticides sur microplaques avec AChE absorbée :

III. Résultats et discussion

comparaison de l'inhibition obtenue avec des solutions standard (tampon) et après extraction de l'huile d'olive (échantillons naturels)

Les différences observées entre les pourcentages d'inhibition obtenus avec les standards et ceux des échantillons naturels peuvent s'expliquer par des problèmes d'interférences rencontrées au niveau de la lecture optique des microplaques en ce qui concerne les échantillons réels (persistance de gouttelettes d'huile).

5. Conclusion

L'immobilisation de l'acétylcholinestérase d'anguille électrique par adsorption sur des microplaques MaxiSorp™ conduit à la préparation d'un bioessai optique performant, capable de détecter les trois organophosphorés dans des échantillons naturels d'huile d'olive après une rapide extraction liquide-liquide. Les dispositifs développés présentent une stabilité opérationnelle satisfaisante ainsi qu'une bonne stabilité au stockage à 4°C. Ils présentent aussi des performances analytiques remarquables avec des limites de détection très inférieures à la limite maximale de résidus tolérée par les réglementations internationales (LMR). Une comparaison entre les limites de détection obtenues par ces outils et les LMRs pour ces trois pesticides est présentée dans le tableau 7 (source : Ministère Français de l'Agriculture et de l'Agroalimentaire, 2012). Il est à noter que les limites de détection reportées sont obtenues par application des biocapteurs sur des échantillons naturels d'huile d'olive, on constate que ces valeurs sont similaires à celles obtenues avec les solutions standards (voir tableau 6).

III. Résultats et discussion

Tableau 7: Comparaison entre les limites de détection obtenues par les dispositifs basés sur l'adsorption de l'AChE sur des microplaques et les LMRs tolérées par la réglementation française (ppm : partie par million).

	LMR (AF920805)	Limite de détection
Malaoxon	0,5 ppm	0,001 ppm ($6,3 \cdot 10^{-9}$ M)
Méthidathion-oxon	1 ppm	0,002 ppm ($1,03 \cdot 10^{-8}$ M)
Ométhoate	2 ppm	0,3 ppm ($1,7 \cdot 10^{-6}$ M)

B. Immobilisation par liaisons covalentes sur des billes magnétiques

Une des méthodes d'immobilisation testée au cours de ce travail est l'immobilisation par des liaisons covalentes sur des billes magnétiques. Après activation et immobilisation des billes sur les différents supports, les biocapteurs développés ont été testés par des mesures ampérométriques ainsi que spectrophotométriques sur des solutions standards et des échantillons réels d'huile d'olive. Les résultats obtenus pour les deux méthodes de détection sont présentés ci-dessous.

Avant immobilisation et afin de vérifier l'efficacité du couplage covalent, des billes chargées par l'enzyme en utilisant le glutaraldéhyde et des billes non activées ont été testées par des mesures ampérométriques. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 30.

III. Résultats et discussion

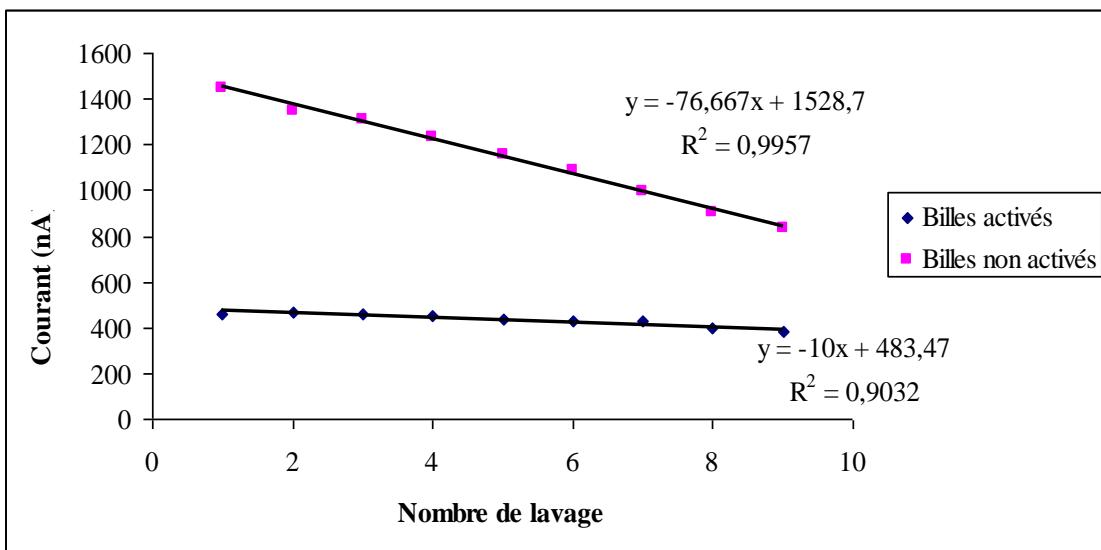


Figure 30 : Comparaison de la réponse des biocapteurs préparés avec des billes magnétiques activées ($AChE +$ glutaraldéhyde) et des billes non activées ($AChE$ seule).

Il apparaît que les biocapteurs préparés en absence de glutaraldéhyde donnent une réponse très élevée, qui diminue progressivement après chaque lavage pour arriver à 60 % d'activité au 9^{ème} essai. En revanche, les billes activées au glutaraldéhyde conduisent à la préparation d'un capteur caractérisé par une réponse moyenne plus fiable, d'environ 350 nA, mais stable au cours du temps.

La stabilité au stockage a été évaluée en mesurant l'activité enzymatique de l'acétylcholinestérase immobilisée sur des billes magnétiques conservées à 4°C, chaque jour pendant un mois. Il apparaît que les billes chargées perdent près de 50 % de leur activité après un mois à 4°C.

III. Résultats et discussion

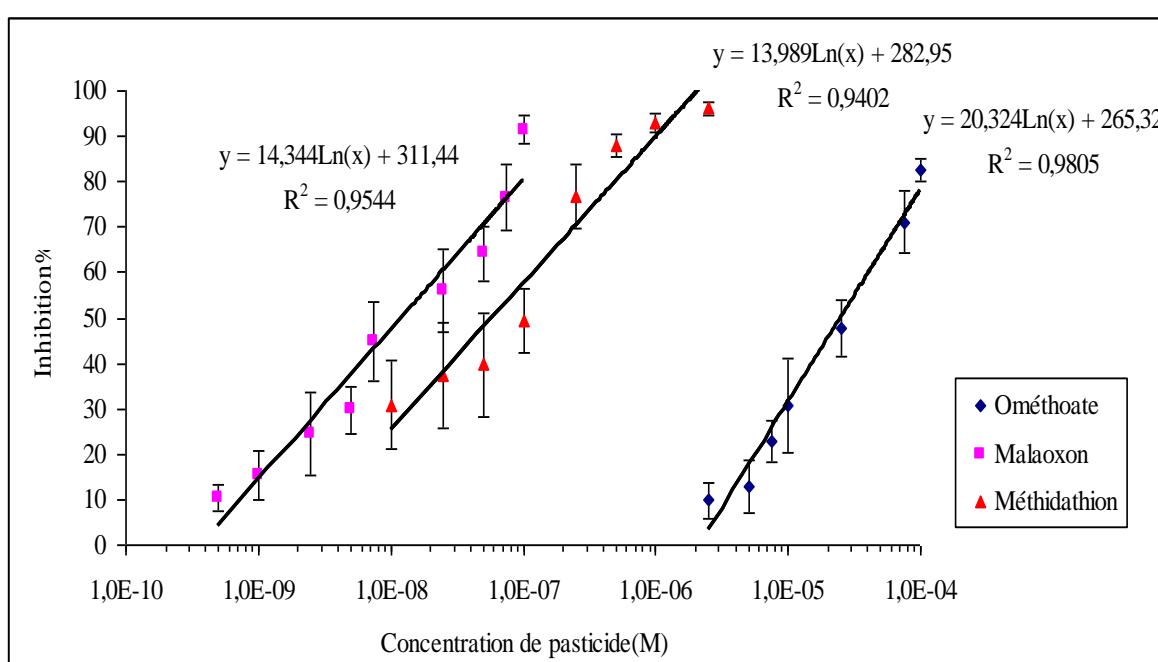
1. Détection colorimétrique

a. Optimisation du temps de réaction

Le temps de réaction du substrat acétylthiocholine avec l'AChE immobilisée a été étudié en mesurant spectrophotométriquement à 405 nm l'apparition du complexe jaune après 5, 10, 15, 20 et 30 min d'incubation. Il a été montré que la réaction est totalement accomplie après 30 min d'incubation en absence de pesticide. Ce temps sera utilisé dans la suite du travail pour le dosage de l'activité enzymatique ainsi que les mesures d'inhibition.

b. Détection des organophosphorés par la méthode colorimétrique

Dans cette partie 1 μL d'une solution enzymatique de 4,41 UI/mL a été déposé à l'aide d'une micropipette dans chaque puits de la microplaquette contenant 200 μL du tampon phosphate. L'effet d'inhibition du malaoxon, du méthidathion oxydé et de l'ométhoate sur l'AChE a été étudié en utilisant un temps d'incubation de 10 min et un temps de mesure de 30 min. Les résultats représentant les taux d'inhibition obtenus en fonction de la concentration d'insecticides sont présentés sur la figure 31.



III. Résultats et discussion

Figure 31 : Droites de calibration obtenues avec un capteur optique à AChE immobilisée sur des billes magnétiques déposées sur des microplaques.

Comme mentionné dans la partie matériaux et méthodes (tableau 4), l’immobilisation par liaisons covalentes sur des billes magnétiques est plus compliquée et plus difficile à reproduire que les autres méthodes. Cela se traduit par la faible reproductibilité des dispositifs préparés selon cette méthode, exprimée par la forte amplitude des barres d’erreurs reportées sur la figure 31.

Les performances analytiques des capteurs développés sont résumées dans le tableau 8. Il apparait que les outils développés présentent une bonne performance analytique avec des limites de détection très satisfaisantes, de l’ordre de 10^{-9} M pour le malaoxon et le méthidathion oxydé et 10^{-6} M pour l’ométhoate.

Tableau 8 : Performances des tests en microplaques à AChE immobilisée sur les billes magnétiques pour la détection du malaoxon, du méthidathion oxydé et de l’ométhoate (IC= concentration inhibitrice, IC₁₀= limite de détection.)

	IC ₁₀ (M)	IC ₅₀ (M)	IC ₁₀₀ (M)
Malaoxon	$7,4 \cdot 10^{-10}$	$1,2 \cdot 10^{-8}$	$3,9 \cdot 10^{-7}$
Méthidathion	$3,3 \cdot 10^{-9}$	$5,8 \cdot 10^{-8}$	$2,0 \cdot 10^{-6}$
Ométhoate	$3,5 \cdot 10^{-6}$	$2,5 \cdot 10^{-5}$	$2,9 \cdot 10^{-4}$

Les résultats obtenus montrent que l’immobilisation de l’enzyme sur des microplaques a montré une reproductibilité satisfaisante avec une réponse stable. Le dispositif en microplaques s’avère très économique, il présente l’avantage de pouvoir traiter un grand nombre d’échantillons en même temps et est peu coûteuse en réactifs en raison des faibles

III. Résultats et discussion

volumes utilisés. Toutefois, la manipulation de ces volumes réduits semble être responsable de la faible reproductibilité des résultats obtenus.

c. Application sur des échantillons naturels

Comme pour l'immobilisation par adsorption, des essais ont été menés en utilisant des échantillons naturels d'huile d'olive. Les pourcentages d'inhibitions induits par les différentes concentrations de pesticides issues de solutions standards ou obtenues après extraction sont présentés dans la figure 32.

III. Résultats et discussion

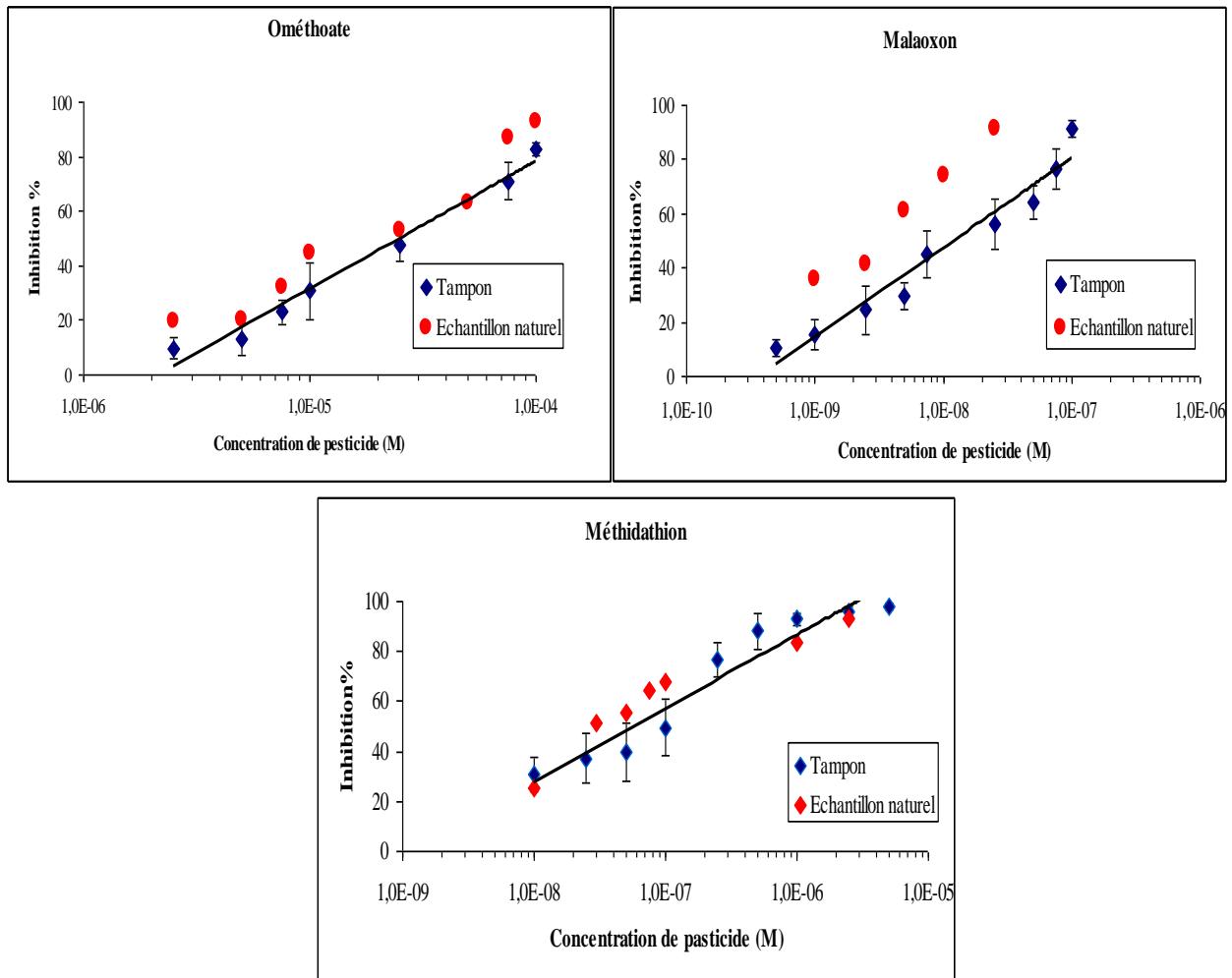


Figure 32 : Essais de détection des 3 insecticides sur microplaques avec AChE immobilisée sur des billes magnétiques : comparaison de l'inhibition obtenue avec des solutions standard (tampon) et après extraction de l'huile d'olive (échantillons naturels)

Les résultats montrent une corrélation satisfaisante entre les valeurs obtenues avec les standards et les échantillons naturels, la différence remarquée peut être expliquée par l'effet de matrice et les perturbations au niveau de la lecture spectrophotométrique. Les limites de détection obtenues avec les échantillons naturels sont présentées dans le tableau 9.

Tableau 9: Limites de détection des tests en microplaques à AChE immobilisée sur des billes magnétiques appliqués au dosage d'échantillons naturels.

III. Résultats et discussion

Pesticide	Ométhoate	Malaoxon	Méthidathion
Limite de détection (M)	$2,2 \cdot 10^{-6}$	$3,2 \cdot 10^{-10}$	$1,9 \cdot 10^{-9}$

L'application sur des échantillons naturels du biocapteur optique conçu par immobilisation de l'acétylcholinestérase par le biais de billes magnétiques donne des limites de détection identiques à celles obtenues avec des solutions standard de pesticides. L'outil analytique développé est donc adapté au dosage de ces pesticides dans l'huile d'olive.

2. Détection ampérométrique

a. Détermination du temps d'incubation

La détection ampérométrique des trois pesticides a été réalisée en testant des temps d'incubation de 2, 5, 10, 15 et 20 min pour une concentration choisie aléatoirement de chaque pesticide : $2,5 \cdot 10^{-5}$ M pour l'ométhoate, $2,5 \cdot 10^{-7}$ M pour le méthidathion oxydé et 10^{-6} M pour le malaoxon. Les taux d'inhibition obtenus pour chaque pesticide en fonction du temps d'incubation sont présentés sur la figure 33.

III. Résultats et discussion

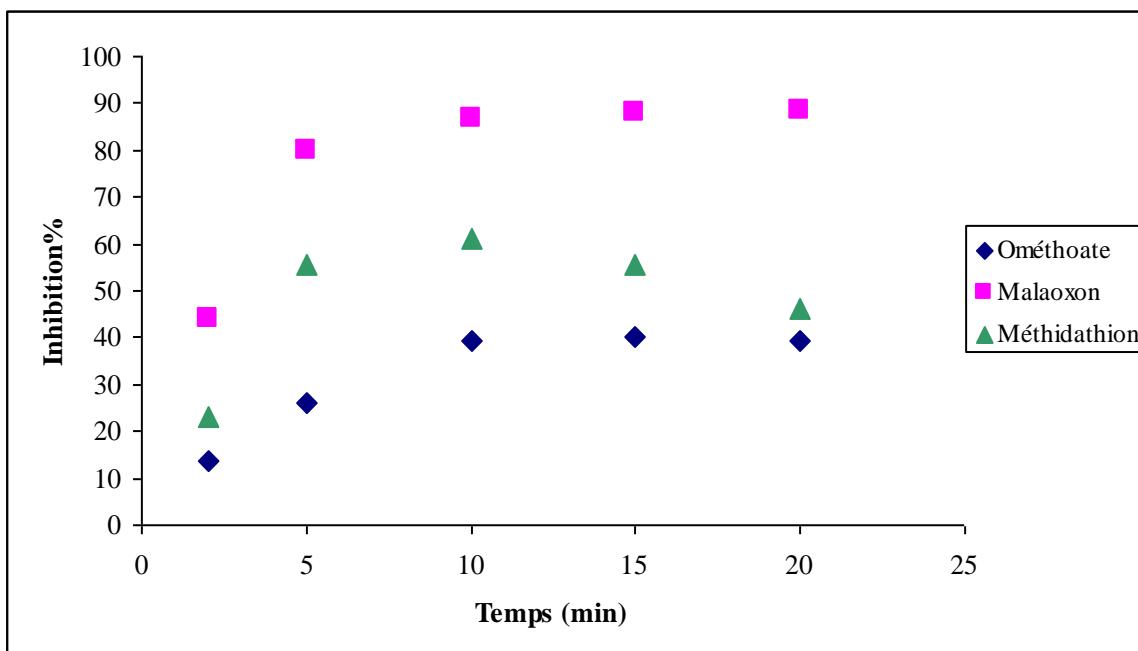


Figure 33 : Influence du temps d'incubation sur le pourcentage d'inhibition. Détection de l'ométhoate à $2,5 \cdot 10^{-5} M$, du méthidathion oxydé à $2,5 \cdot 10^{-7} M$ et du malaoxon à $10^{-6} M$.

Il apparaît clairement que pour une concentration donnée de pesticide, le taux d'inhibition augmente avec le temps d'incubation, ce phénomène étant caractéristique d'une inhibition irréversible, jusqu'à l'obtention d'un plateau pour lequel le taux d'inhibition ne varie plus. Ce plateau ayant été obtenu à partir de 10 min pour les concentrations de pesticide testées, ce temps d'incubation sera utilisé dans la suite du travail pour tous les tests ampérométriques.

b. Caractéristiques des biocapteurs

La stabilité opérationnelle des biocapteurs développés a été testée afin de s'assurer que toute diminution du signal est liée à l'inhibition de l'enzyme par les pesticides et non pas au relargage de celle-ci. Ce paramètre a été estimé par des mesures répétitives de la réponse d'une électrode unique à 1 mM d'acétylthiocoline chloride, avec rinçage de la cellule et de l'électrode à l'eau distillée entre les mesures. Dans ces conditions, les capteurs conçus ont

III. Résultats et discussion

montré une bonne stabilité opérationnelle pendant au moins 10 mesures consécutives avec un écart relatif (R.S.D : relative standard deviation) de 3 % (300 ± 10 nA). La reproductibilité des mesures d'inhibition a été aussi estimée à partir de 6 déterminations du pourcentage d'inhibition provoqué par une concentration de 3.10^{-8} M de méthidathion oxydé. Dans ces conditions, le RSD observé est de 4 % (217 ± 10 nA), indiquant une bonne reproductibilité des mesures d'inhibition.

c. Détection des organophosphorés

Les mesures d'inhibition ont été réalisées en utilisant un temps d'incubation de 10 min pour des concentrations comprises entre 10^{-6} M et 10^{-4} M pour l'ométhoate, et entre 10^{-9} M à 5.10^{-6} M pour le méthidathion oxydé et le malaoxon. Les résultats représentant les taux d'inhibition obtenus en fonction de la concentration d'insecticide sont présentés sur la figure 34.

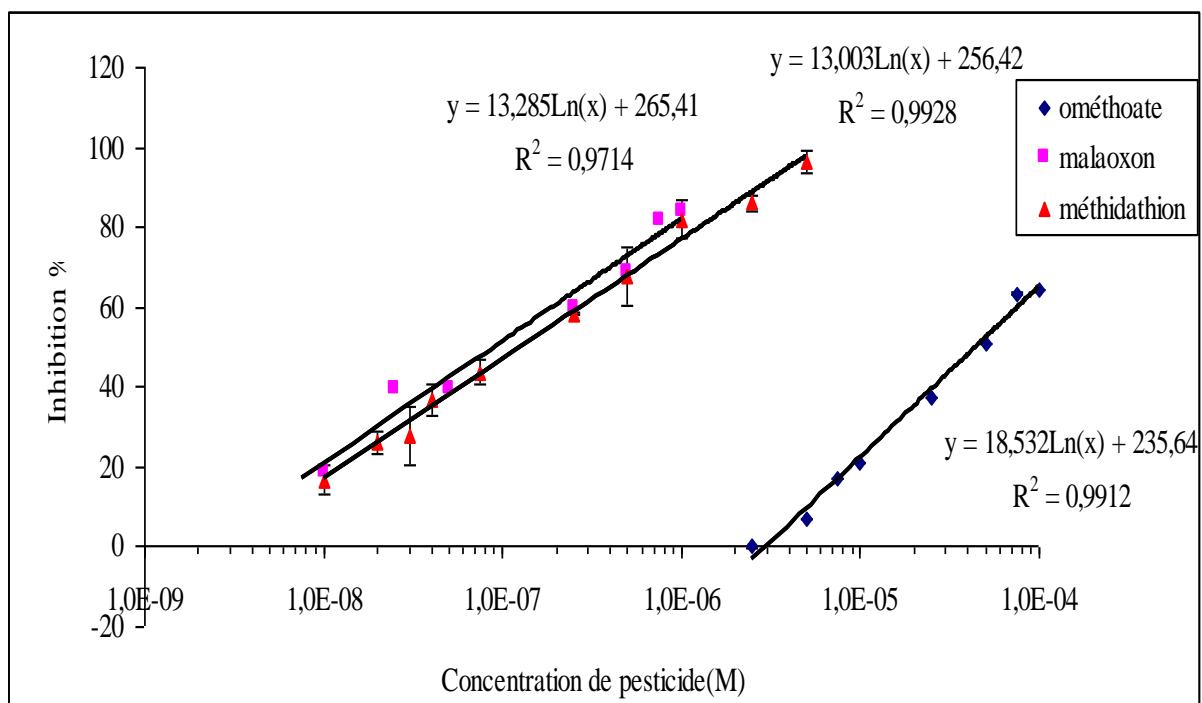


Figure 34: Droites de calibration obtenues avec un capteur ampérométrique à AChE immobilisée sur des billes magnétiques.

III. Résultats et discussion

À partir des barres d'erreurs obtenues, on constate une bonne reproductibilité des mesures confirmant une bonne reproductibilité du capteur développé, les faibles variations des mesures peuvent être expliquées par la dénaturation partielle de l'enzyme due à l'agent de réticulation toxique utilisé. Les performances analytiques de ce capteur ampérométrique pour la détection des pesticides étudiés sont présentées dans le tableau 10.

Tableau 10 : Performances analytiques du capteur ampérométrique à AChE pour la détection des trois pesticides étudiés (IC= concentration inhibitrice, IC₁₀= limite de détection.)

	IC ₁₀ (M)	IC ₅₀ (M)	IC ₁₀₀ (M)
Ométhoate	5,1.10 ⁻⁶	4,4.10 ⁻⁵	6,6.10 ⁻⁴
Méthidathion Oxydé	8,8.10 ⁻⁹	1,3.10 ⁻⁷	5,9.10 ⁻⁶
Malaoxon	4,4.10 ⁻⁹	1,0.10 ⁻⁷	3,9.10 ⁻⁶

Le biocapteur conçu permet d'obtenir des limites de détection très satisfaisantes pour les 3 organophosphorés cibles : de l'ordre de 10⁻⁹ M pour le malaoxon et le méthidathion oxydé et 10⁻⁶ M pour l'ométhoate.

d. Application sur les échantillons naturels d'huile d'olive

Des tests ont été réalisés afin de comparer le taux d'inhibition du biocapteur observé en présence de solutions standard de pesticides et d'extraits d'huile d'olive dopée avec les mêmes concentrations de pesticides. Les résultats présentés sur la figure 35 montrent une

III. Résultats et discussion

bonne corrélation entre les résultats obtenus à partir de solutions standards et d'échantillons naturels.

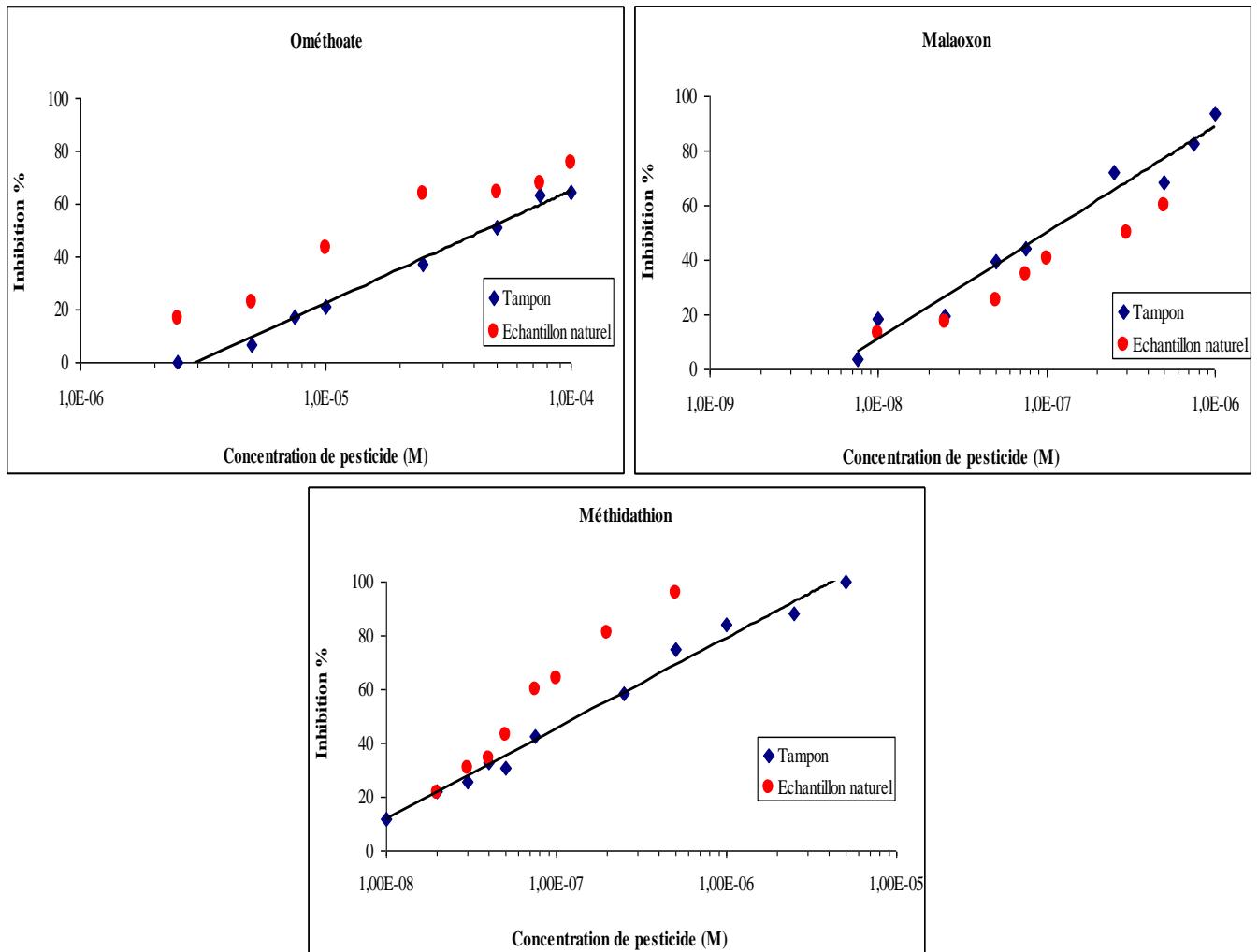


Figure 35 : Essais de détection des 3 insecticides par biocapteur ampérométrique à AChE immobilisée sur des billes magnétiques : comparaison de l'inhibition obtenue avec des solutions standard (tampon) et après extraction de l'huile d'olive (échantillons naturels).

Les limites de détection obtenues par ce biocapteur ampérométrique appliqué sur les échantillons naturels d'huile d'olive sont présentées dans le tableau 11. On constate que même appliqué à une matrice complexe telle que l'huile d'olive, le biocapteur développé donne des limites de détection très satisfaisantes et identiques à celles obtenues avec des standards préparés dans le tampon.

III. Résultats et discussion

Tableau 11: Limites de détection des biocapteurs ampérométriques à AChE immobilisée sur des billes magnétiques appliqués au dosage d'échantillons naturels.

Pesticide	Ométhoate	Malaoxon	Méthidathion
Limite de détection (M)	$1,5 \cdot 10^{-6}$	$9,4 \cdot 10^{-9}$	$1,2 \cdot 10^{-8}$

e. Conclusion

Deux dispositifs analytiques ont été développés basés sur une immobilisation covalente de l'AChE sur des billes magnétiques, l'un à détection optique, l'autre à détection ampérométrique. Les systèmes mis au point ont été appliqués à la détection des trois organophosphorés en solutions standard tamponnées et à partir d'extraits d'huile d'olive. Dans les deux cas, de bonnes performances analytiques ainsi qu'une bonne reproductibilité et stabilité ont été obtenues, bien que ces deux derniers critères aient été moins satisfaisants dans le cas du système optique, probablement en raison des faibles volumes manipulés et d'interférences au niveau de la lecture spectrophotométrique. Les limites de détection obtenues sont très satisfaisantes et très inférieures à la limite maximale de résidus tolérés par les réglementations internationales (LMR). Une comparaison entre les limites de détection observées pour l'analyse d'échantillons réels d'huile d'olive et des LMRs définies par le Ministère français de l'Agriculture et de l'Agroalimentaire 2012 est présentée dans le tableau 12.

III. Résultats et discussion

*Tableau 12: Comparaison entre les limites de détection obtenues par les dispositifs mettant en jeu des billes magnétiques et les LMRs tolérées par la réglementation française.
(ppm : partie par million).*

	LMR (AF920805)	Limite de détection	
		Détection optique	Détection ampérométrique
Malaoxon	0,5 ppm	0,0001 ppm	0,002 ppm
Méthidathion oxydé	1 ppm	0,0005 ppm	0,003 ppm
Ométhoate	2 ppm	0,4 ppm	0,3 ppm

C. Immobilisation par bioencapsulation dans une matrice sol-gel

La dernière méthode testée dans ce travail est l’immobilisation par bioencapsulation dans une matrice sol-gel. L’enzyme a été immobilisée à la surface d’une électrode sérigraphie (capteur ampérométrique) et sur des microplaques (capteur optique). Les performances analytiques, la stabilité opérationnelle ainsi que la stabilité au stockage des deux dispositifs développés sont détaillées ci-dessous.

III. Résultats et discussion

1. Détection optique

a. Détermination de temps d'incubation

Le temps d'incubation nécessaire pour la réaction entre l'enzyme et le substrat a été évalué en mesurant l'absorbance en continu pendant 30 min à l'aide d'un lecteur de microplaques. Il apparaît, à partir de la cinétique obtenue, que la réaction est complète 30 min après l'ajout de substrat. Ce temps de réaction a donc été appliqué pour toutes les mesures d'activité et d'inhibition.

b. Caractéristiques des dispositifs analytiques

La stabilité au stockage des dispositifs a été évaluée en mesurant l'activité enzymatique chaque jour pendant deux mois. Une bonne stabilité est observée, avec une diminution de près de 10 % d'activité après un mois de stockage à 4°C et 21 % après 2 mois (figure 36). Ces résultats confirment que la matrice sol-gel joue un rôle protecteur en augmentant la durée de vie de l'enzyme (Andreeescu, 2002).

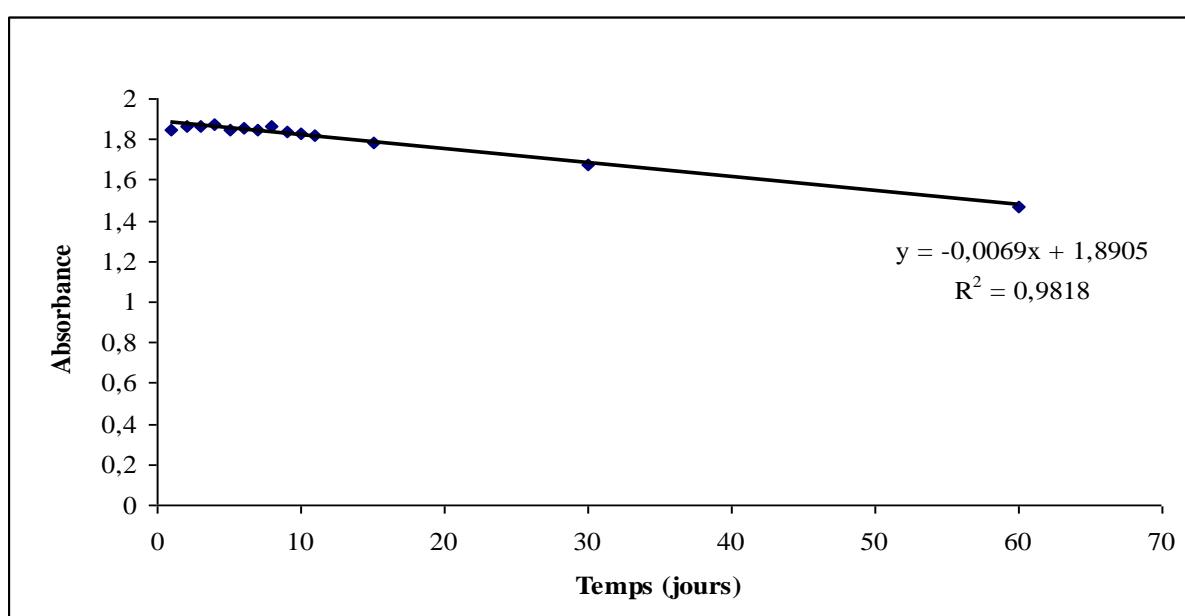


Figure 36 : Stabilité au stockage des dispositifs préparés par immobilisation de l'acétylcholinestérase sur microplaquette dans une matrice sol-gel.

III. Résultats et discussion

c. Détection des organophosphorés

Les pourcentages d'inhibition obtenus pour chaque concentration après incubation des pesticides pendant 10 min sont présentés sur la figure 37.

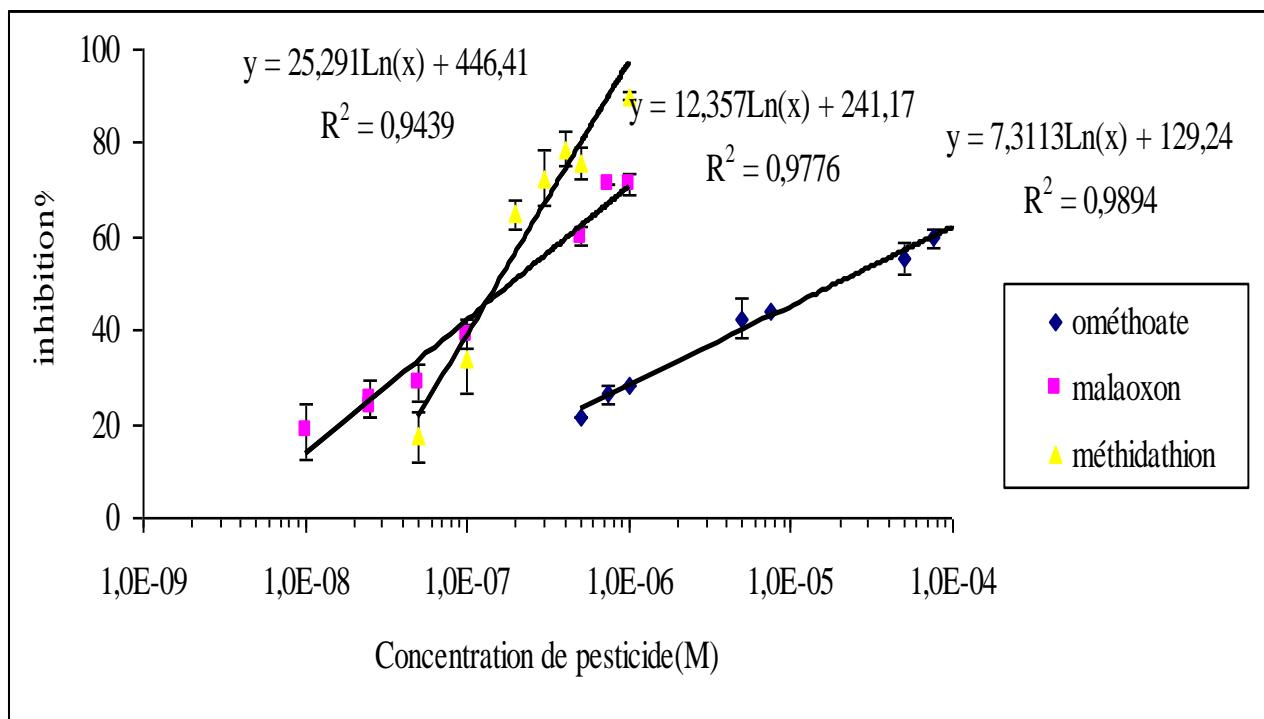


Figure 37: Droites de calibration obtenues avec un capteur optique à AChE immobilisée dans une matrice sol-gel.

D'après le graphe, on constate la faible reproductibilité des mesures, qui peut être expliquée par la difficulté de contrôler la quantité d'enzyme immobilisée, en raison de la viscosité de la solution sol-gel/enzyme et, comme pour les autres tests optiques, à la manipulation de faibles volumes.

Les performances analytiques du capteur développé sont présentées dans le tableau 13. On constate des limites de détection très satisfaisantes mais inférieures à celles obtenues par les biocapteurs basés sur l'immobilisation de l'AChE sur des billes magnétiques. Cette différence

III. Résultats et discussion

peut être mise en relation avec la présence de la barrière de diffusion représentée par la matrice sol-gel.

*Tableau 13 : Performances analytiques du dispositif optique à AChE immobilisée dans une matrice sol-gel pour la détection des trois pesticides étudiés
(IC= concentration inhibitrice, IC₁₀= limite de détection.)*

	IC ₁₀ (M)	IC ₅₀ (M)	IC ₁₀₀ (M)
Malaoxon	7,5.10 ⁻⁹	1,9.10 ⁻⁷	1,0.10 ⁻⁵
Méthidathion oxydé	3,2.10 ⁻⁸	1,5.10 ⁻⁷	1,1.10 ⁻⁶
Ométhoate	8,2.10 ⁻⁸	1,9.10 ⁻⁵	1,2.10 ⁻²

d. Application sur les échantillons naturels d'huile d'olive

Comme pour les autres méthodes, des tests ont été réalisés afin de comparer le taux d'inhibition du biocapteur observé en présence de solutions standard de pesticides et d'extraits d'huile d'olive dopée avec les mêmes concentrations de pesticides. Les résultats présentés sur la figure 38 montrent une corrélation satisfaisante, quoique moins bonne que pour les autres systèmes développés.

III. Résultats et discussion

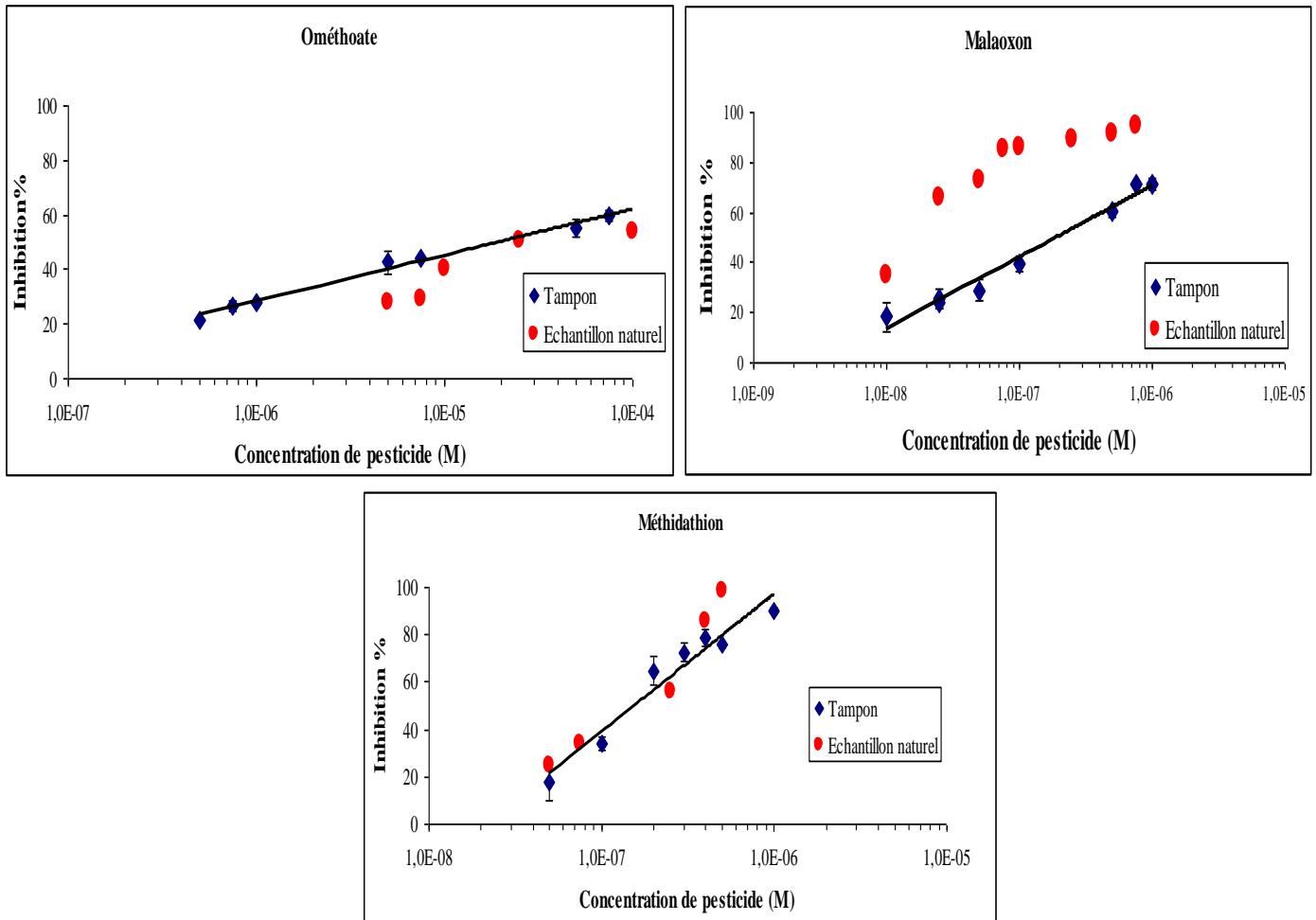


Figure 38: Essais de détection des 3 insecticides par un dispositif optique à AChE immobilisée dans une matrice sol-gel : comparaison de l'inhibition obtenue avec des solutions standard (tampon) et après extraction de l'huile d'olive (échantillons naturels)

2. Détection ampérométrique

a. Caractéristiques des biocapteurs

Au cours des mesures d'inhibition, la réponse d'un biocapteur au substrat doit rester stable afin d'éviter tout faux-positif dû à un éventuel relargage de l'enzyme. L'immobilisation de l'acétylcholinestérase par encapsulation dans une matrice sol-gel a conduit à la préparation d'électrodes caractérisées par une stabilité remarquable. En ce qui concerne la stabilité opérationnelle, les biocapteurs présentent une réponse maximale pour 10 mesures successives, la réponse moyenne étant de 450 ± 15 nA, indiquant une bonne reproductibilité des mesures.

III. Résultats et discussion

La reproductibilité de l'inhibition a été également testée en mesurant 5 fois le pourcentage d'inhibition produit par 10^{-8} M de malaoxon, les résultats obtenus ont montré une bonne reproductibilité du dispositif mis au point avec un écart-type relatif (RSD) de 3 % (324 ± 10 nA). En ce qui concerne la stabilité au stockage, aucune perte d'activité n'a été observée après 1 mois de stockage à -18°C des électrodes dans des sacs de plastiques fermés, alors que stockées à 4°C les électrodes perdent jusqu'à 50 % de leur activité initiale.

b. Détection des organophosphorés

L'effet d'inhibition du malaoxon, du méthidathion oxydé et de l'ométhoate sur l'acétylcholinestérase immobilisée par encapsulation dans une matrice sol-gel a été étudié en incubant les biocapteurs dans une solution contenant une concentration connue d'insecticide pendant 10 min. Les résultats représentant les taux d'inhibition obtenus en fonction de la concentration d'insecticide sont présentés sur la figure 39.

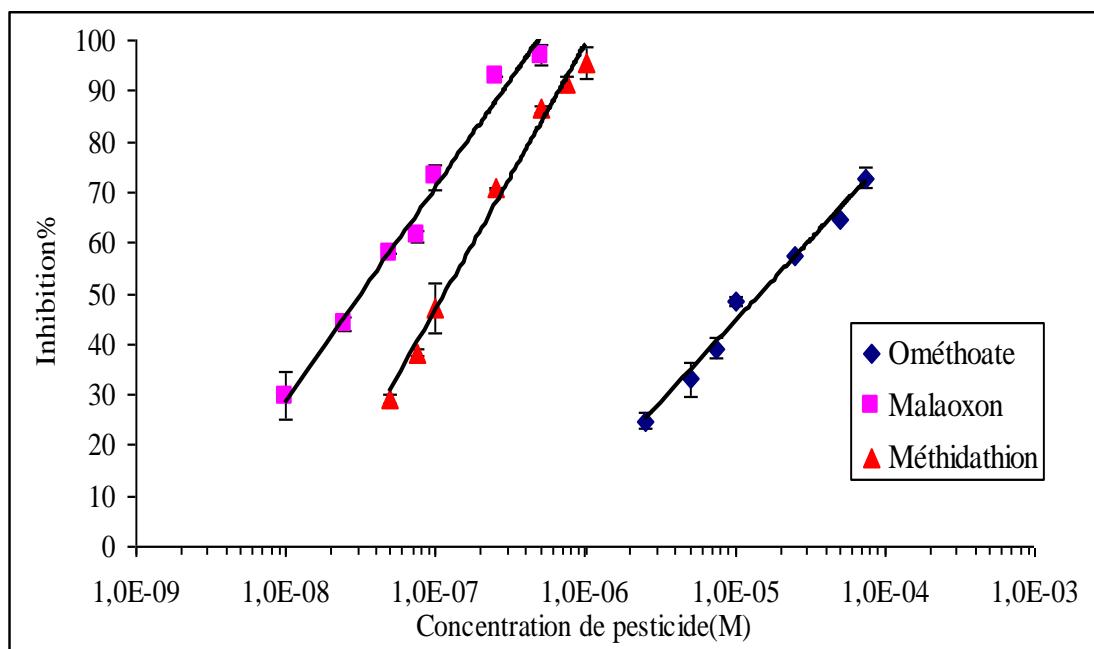


Figure 39: Droites de calibration obtenues avec un capteur ampérométrique à AChE immobilisée par encapsulation dans une matrice sol-gel.

III. Résultats et discussion

On constate une très bonne reproductibilité des mesures avec des barres d'erreurs très faibles. Comme prévu, le biocapteur présente une limite de détection très faible pour le malaoxon et le méthidathion oxydé, tandis que l'ométhoate est détecté avec une sensibilité plus faible. Les performances analytiques du capteur développé sont résumées dans le tableau 14.

Tableau 14 : Performances analytiques du capteur ampérométrique à AChE immobilisée dans une matrice sol-gel pour la détection des trois pesticides étudiés.

	I ₁₀ (M)	I ₅₀ (M)	IC ₁₀₀ (M)
Ométhoate	4,3.10 ⁻⁷	1,5.10 ⁻⁵	5,58.10 ⁻⁴
Méthidathion oxydé	2,0.10 ⁻⁸	1,1.10 ⁻⁷	1,0.10 ⁻⁶
Malaoxon	3,6.10 ⁻⁹	3,2.10 ⁻⁸	4,9.10 ⁻⁷

c. Application sur les échantillons naturels d'huile d'olive

Afin de démontrer leur viabilité, les biocapteurs développés ont été appliqués, comme pour les deux méthodes précédentes, à la détection des trois insecticides dans des extraits d'huile d'olive après extraction liquide-liquide. Un essai à blanc a été précédemment effectué afin de vérifier l'absence de tout autre insecticide déjà présent dans l'huile d'olive. L'huile non dopée n'a révélé aucun effet d'inhibition, alors que les échantillons dopés présentent des degrés d'inhibition du même ordre que les standards (figure 40). Ainsi, les biocapteurs basés sur l'immobilisation par encapsulation dans une matrice sol-gel ont montré une bonne capacité à détecter les trois pesticides dans des échantillons naturels, avec un pourcentage de recouvrement proche de 100 % pour toutes les concentrations testées.

III. Résultats et discussion

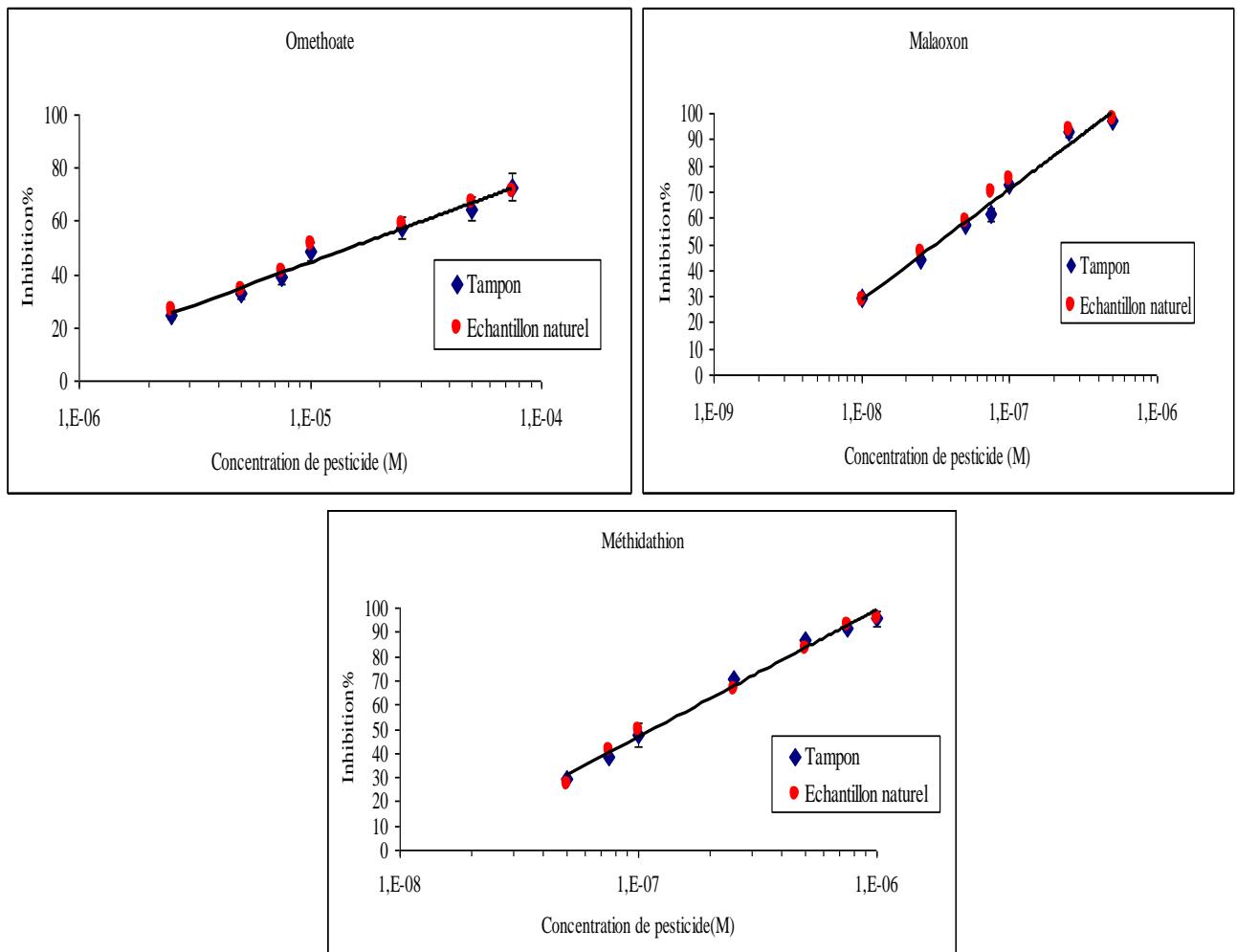


Figure 40 : Essais de détection des 3 insecticides par un biocapteur ampérométrique à AChE immobilisée dans une matrice sol-gel : comparaison de l'inhibition obtenue avec des solutions standard (tampon) et après extraction de l'huile d'olive (échantillons naturels).

d. Conclusion

La méthode sol-gel a abouti à la préparation de deux dispositifs analytiques basés sur deux modes de détection différents : optique et ampérométrique. Ces deux outils présentent une bonne stabilité opérationnelle, une bonne stabilité au stockage et une bonne reproductibilité. Malheureusement lors de l'application sur des échantillons naturels, le capteur optique a donné des résultats peu fidèles à ceux obtenus avec des solutions standard de pesticides,

III. Résultats et discussion

contrairement au biocapteur ampérométrique qui a donné des résultats en très bonne corrélation, avec un taux de recouvrement de 100 %.

La sensibilité des deux systèmes s'est révélée presque identique, et comme pour les autres méthodes d'immobilisation, les limites de détection obtenues sont très inférieures aux LMRs tolérées par la réglementation française. Le tableau 15 présente une comparaison entre les limites de détection obtenues lors application sur des échantillons naturels d'huile d'olive et les LMRs recommandées par le ministère français de l'Agriculture et de l'Agroalimentaire 2012.

Tableau 15: Comparaison entre les limites de détection obtenues par les dispositifs basés sur une immobilisation sol-gel et les LMRs tolérées par la réglementation française.

(ppm : partie par million)

	LMR (AF920805)	Limite de détection	
		Détection optique	Détection ampérométrique
Malaoxon	0,5 ppm	0,001 ppm	0,001 ppm
Méthidathion oxydé	1 ppm	0,006 ppm	0,005 ppm
Ométhoate	2 ppm	0,09 ppm	0,01 ppm

III. Résultats et discussion

III.3. Comparaison entre les différents capteurs développés

Les résultats obtenus montrent que les dispositifs analytiques basés sur l'immobilisation de l'AChE par encapsulation dans une matrice sol-gel sont plus reproductibles et plus stables que ceux obtenus par immobilisation sur billes magnétiques ou par adsorption, ce qui confirme le rôle protecteur de la matrice sol-gel sur l'activité de l'enzyme. Le manque de reproductibilité des autres méthodes peut être expliqué par la difficulté de contrôler la quantité d'enzyme immobilisée pour l'adsorption, et par la dénaturation partielle de l'enzyme due à l'utilisation du glutaraldéhyde (immobilisation sur billes magnétiques). En ce qui concerne la sensibilité, les différents outils développés présentent des sensibilités comparables, les meilleures performances étant obtenues pour les méthodes mettant en jeu l'immobilisation sur billes magnétiques. Ceci peut s'expliquer par l'absence de barrières de diffusions permettant une meilleure accessibilité de l'enzyme pour le substrat et l'inhibiteur. De manière générale, les limites de détection obtenues pour les 5 systèmes sont au moins 100 fois inférieures à la limite maximale de résidus tolérée par la réglementation française.

D'autre part, les méthodes mettant en jeu une détection ampérométrique (électrodes) se sont montrées plus reproductibles et stables que celles impliquant une détection optique (microplaques). Dans ce dernier cas, les paramètres limitants sont les faibles volumes mis en jeu, qui nuisent à la reproductibilité et les interférences dues à la matrice observées lors des mesures spectrophotométriques.

Lors de l'analyse d'échantillons réels après extraction liquide-liquide, tous les outils développés ont donné des pourcentages d'inhibition en bonne corrélation avec ceux obtenus en utilisant des solutions standards de laboratoire. Les meilleurs résultats ont été obtenus en

III. Résultats et discussion

utilisant des biocapteurs ampérométriques basés sur l'immobilisation de l'enzyme par piégeage dans une matrice sol-gel, un taux de recouvrement de 100 % étant observé pour les trois insecticides étudiés.

Le seul problème posé est le manque de sélectivité des systèmes de détection développés, le pouvoir inhibiteur étant extrêmement variable d'un insecticide à l'autre.

III.4. Association Biocapteur-MIPs

La faible sélectivité des systèmes mis au point dans ce travail peut constituer un inconvénient lorsque la nature de l'insecticide utilisé n'est pas identifiée, ou plus généralement lorsqu'on a affaire à des mélanges de substances actives. Ce problème peut être contourné de différentes manières, par exemple des travaux ont été menés au laboratoire IMAGES sur des systèmes complexes mettant en jeu plusieurs enzymes et une analyse des données par des réseaux neuronaux artificiels (Alonso *et al.*, 2010). Dans ce travail, nous avons choisi une approche différente, couplant la détection par biocapteur à une méthode d'extraction par polymères à empreinte moléculaire (MIPs), capables d'extraire un seul pesticide cible dans un mélange complexe. Le biocapteur ampérométrique basé sur l'immobilisation de l'acétylcholinestérase par piégeage dans une matrice sol-gel a été choisi pour ce travail en raison de ses performances optimales pour le dosage des insecticides après extraction de l'huile d'olive. Les colonnes d'extraction à polymères à empreintes moléculaire MIPs ont été spécialement conçues pour les trois pesticides cibles au cours de la thèse de M. Idriss Bakas.

Avant de tester la sélectivité, des tests de réponse du biocapteur ont été réalisés avec des échantillons issus de cette méthode d'extraction. Une comparaison entre les pourcentages d'inhibition obtenus avec les standards préparés dans du tampon et des solutions issues de l'extraction par MIPs est présentée sur la figure 41.

III. Résultats et discussion

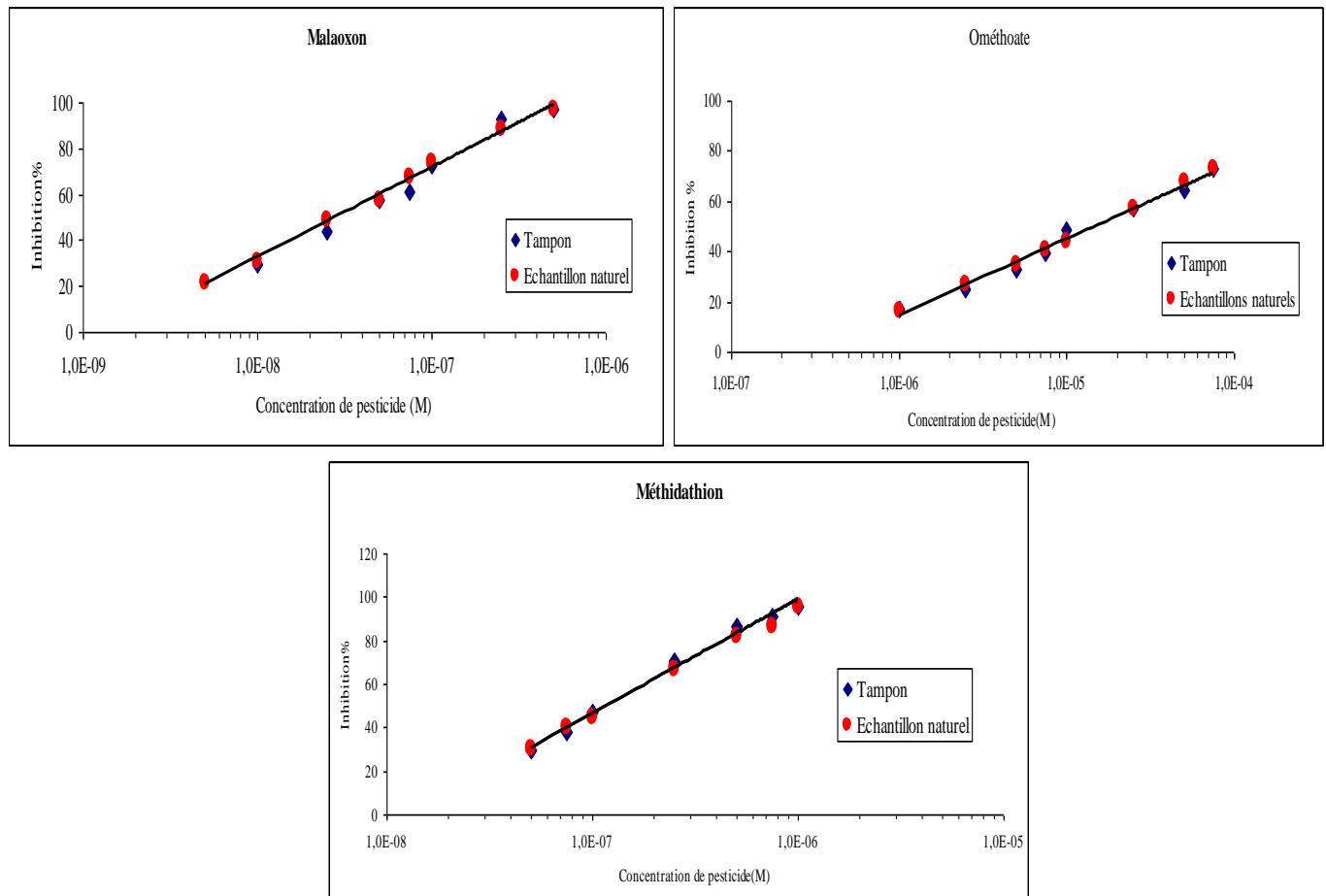


Figure 41 : Essais de détection des 3 insecticides par un biocapteur ampérométrique à AChE immobilisée dans une matrice sol-gel : comparaison de l'inhibition obtenue avec des solutions standard (tampon) et après extraction de l'huile d'olive par MIPs (échantillons naturels).

Les résultats obtenus montrent que les échantillons issus de l'extraction par MIPs d'huile d'olive dopée donnent des pourcentages d'inhibition identiques à ceux obtenus avec des solutions standard. Le taux de recouvrement de 100 % montre la très bonne performance du capteur ainsi que de la méthode d'extraction utilisée.

Des tests de sélectivité ont été réalisés à partir des trois pesticides utilisés seuls ou en mélange à des concentrations voisines de l' IC_{50} . Le protocole d'extraction est décrit dans la partie matériel et méthodes (§II.3.5.2), et résumé pour chaque pesticide dans le tableau 16. 10 mL

III. Résultats et discussion

d'huile d'olive sont dopés avec des concentrations de pesticides de 5.10^{-7} M pour le malaoxon, $2,5.10^{-6}$ M pour le méthidathion oxydé et $2,5.10^{-4}$ M pour l'ométhoate. Le mélange est porté à 45°C pendant 30 min sous agitation, puis 1 mL d'huile est dilué dans 9 mL d'hexane. La solution obtenue est percolée à travers une cartouche contenant les MIPs, et une étape de lavage est effectuée pour éliminer les interférents et les molécules retenues par des interactions non spécifiques (tableau 16).

Tableau 16 : Protocole d'extraction solide-liquide des insecticides organophosphorés en utilisant les polymères à empreinte moléculaire (MIPs)

Polymère	Solution de percolation	Solution de lavage	Solution d'élution
MIP-malaoxon		2 mL dichlorométhane	1 mL méthanol
MIP-méthidathion oxydé	1mL d'huile d'olive dopée + 9 mL d'hexane	2 mL (80% hexane et 20 % dichlorométhane).	1 mL méthanol
MIP-ométhoate		2 mL (85% hexane et 15 % dichlorométhane).	1 mL méthanol

L'élution est effectuée en utilisant 1 mL de méthanol afin de décrocher les molécules cibles, la solution d'élution est ensuite évaporée à sec puis reprise dans 10 mL de tampon phosphate pH 7 afin d'être analysée en utilisant le biocapteur. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 17.

Les résultats montrent que les pourcentages d'inhibition obtenus après extraction des échantillons dopés par un seul pesticide sont conformes aux résultats attendus. En ce qui

III. Résultats et discussion

concerne les MIPs développés pour le méthidathion et le diméthoate, les échantillons dopés par un mélange des 3 pesticides (utilisés chacun à une concentration proche de l'IC₅₀) donnent après extraction des taux d'inhibition similaires à ceux obtenus avec les pesticide seul. Les MIPs synthétisés en utilisant le méthidathion et l'ométhoate comme molécule empreinte se montrent donc très sélectifs pour leurs molécules cibles. En revanche, lorsqu'un échantillon d'huile dopé par les 3 pesticides est extrait à l'aide du MIP développé pour le malaoxon, une inhibition totale du capteur est observée.

Tableau 17 : Taux d'inhibition du biocapteur obtenus après extraction par les MIPs.

Polymère	Solution traitée	Inhibition %
MIP-malaoxon	Huile dopée par le malaoxon	57 %
	Huile dopée par le mélange	100 %
MIP-méthidathion oxon	Huile dopée par le méthidathion	66 %
	Huile dopée par le mélange	68 %
MIP-ométhoate	Huile dopée par l'omethoate	58 %
	Huile dopée par le mélange	61 %

Ainsi, la combinaison biocapteur-MIPs nous a permis de développer un biocapteur sensible et sélectif pour l'ométhoate et le méthidathion, mais pas pour le malaoxon. Lors des tests concernant un mélange de ces trois composés, le biocapteur ne pourra être sélectif que si l'extraction se fait en trois étapes, en utilisant le MIP-malaoxon en dernier lieu. En effet, la solution issue de ces trois extractions ne contiendra que le malaoxon qui peut être facilement détecté par le biocapteur.

Conclusion générale

CONCLUSION GÉNÉRALE

Ce travail décrit la mise au point d'un biocapteur enzymatique ampérométrique pour la détection dans l'huile d'olive de trois pesticides organophosphorés utilisés en oléiculture : le malathion, le méthidathion et le diméthoate, sous leurs formes oxydées. Le biocapteur, basé sur l'immobilisation par la méthode sol-gel d'une acétylcholinestérase sur des électrodes sérigraphiées, a été sélectionné parmi 5 autres outils analytiques dont les performances ont été évaluées. Trois méthodes d'immobilisation ont été testées, basées sur le piégeage de l'enzyme dans une matrice sol-gel, l'immobilisation covalente sur des billes magnétiques, ou une simple adsorption. Deux types de supports ont été utilisés, des plaques de microtitration (96 puits) et des électrodes sérigraphiées, associés respectivement à des méthodes de détection spectrophotométrique et électrochimique. Les différentes combinaisons ont abouti à 5 outils analytiques dont les performances ont été évaluées par application sur des solutions standards de pesticides et sur des extraits d'échantillons naturels d'huile d'olive, issus d'une simple extraction liquide-liquide.

De manière générale, les différents dispositifs ont présenté de bonnes performances analytiques, une bonne reproductibilité et une stabilité opérationnelle acceptable. Ils ont été utilisés avec succès pour l'analyse d'échantillons naturels. Toutefois, les systèmes basés sur l'immobilisation de l'AChE par encapsulation dans une matrice sol-gel se sont avérés plus reproductibles et plus stables que ceux obtenus par immobilisation sur des billes magnétiques ou par adsorption. Le manque de reproductibilité de ces méthodes peut être expliqué par la difficulté de contrôler la quantité d'enzyme immobilisée pour adsorption, et par une dénaturation partielle de l'enzyme due à l'utilisation du glutaraldéhyde.

Conclusion générale

Les différents outils développés présentent des sensibilités comparables vis-à-vis des trois pesticides cibles. Les limites de détection, comprises entre 10^{-6} M pour l'ométhoate et 10^{-10} M pour le malaoxon, sont très satisfaisantes, elles sont au moins 100 fois inférieures à la limite maximale de résidus tolérée par la réglementation française en vigueur. Il est à noter que les limites de détection les plus basses ont été atteintes pour les systèmes basés sur l'immobilisation covalente sur des billes magnétiques, probablement en raison d'une meilleure accessibilité de l'enzyme pour l'inhibiteur.

Lors de l'application sur la matrice réelle d'huile d'olive dopée par les pesticides, tous les outils développés ont donné des pourcentages d'inhibition en bonne corrélation avec les standards. Toutefois, les meilleurs résultats (pourcentage de recouvrement de 100 %) ont été obtenus avec le biocapteur ampérométrique basé sur l'immobilisation de l'enzyme par piégeage dans une matrice sol-gel.

La sélectivité de la détection a été apportée en associant le biocapteur ampérométrique basé sur l'immobilisation sol-gel et une technique d'extraction basée sur de nouveaux polymères à empreinte moléculaire (MIPs). Cette méthode, plus performante que l'extraction liquide-liquide, a été utilisée en amont de la détection. Trois types de polymères à empreintes moléculaires (MIPs) ont été mis au point pour le méthidathion oxydé, l'ométhoate et le malaoxon, ils ont été développés et optimisés dans le cadre d'une thèse complémentaire rentrant dans le même projet que celle-ci.

Des échantillons naturels d'huile d'olive dopée par une molécule cible unique, issus de l'extraction par les MIPs, ont été testés par le biocapteur. Un taux de recouvrement de 100 % et des taux d'inhibition identiques à ceux obtenus avec les standards ont été observés, indiquant une bonne performance du capteur et de la méthode d'extraction. En revanche, l'analyse d'une huile dopée par un mélange des 3 pesticides a montré une bonne

Conclusion générale

sélectivité du MIP-méthidathion et MIP-ométhoate, mais une faible sélectivité du MIP-malaoxon, qui semble retenir d'autres composés que la molécule empreinte.

Ainsi la combinaison biocapteur-MIPs nous a permis de développer un biocapteur sensible et sélectif pour l'ométhoate et le méthidathion, mais pas pour le malaoxon. Ce problème de sélectivité pour le malaoxon peut être contourné par l'utilisation successive de trois colonnes d'extraction.

En conclusion de cette étude, nous avons pu développer un système efficace, sélectif et sensible pour la détection de trois insecticides organophosphorés dans une matrice complexe telle que l'huile d'olive. Le dispositif associe la sélectivité de l'extraction sur polymères à empreintes moléculaires et la sensibilité du biocapteur à acétylcholinestérase.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Aldridge**, W.N. (1950). Some properties of specific cholinesterase with particular to the mechanism of inhibition by diethyl p-nitrophenyl thiophosphate (E 605) and analogues. *Biochem. J.*, 4, 451-460.
- Alonso**, G., Istamboulie, G., Ramírez-García, A., Noguer, T., Marty J-L, Munoz, R. (2010). Artificial neural network implementation in single low-cost chip for the detection of insecticides by modelling of screen-printed enzymatic sensors response. *Comput. Electron. Agric.*
- Alvarez**, G. S., Desimone, M. F., Diaz, L. E. (2007). Immobilization of bacteria in silica matrices using citric acid in the sol-gel process. *Applied Microbiol. Biotechnol.*, 73, 1059–1064.
- Andreescu**, S. (2002). Biocapteurs à acetylcholinesterase pour la détection sensible et spécifique des insecticides organophosphorus. Thèse de doctorat de l'université de Perpignan.
- Andreescu**, S., Barthelmebs, L., Marty, J-L. (2002). Immobilisation of AChE on screen-printed electrodes; Comparative study between three immobilisation methods; Applications to the detection of organophosphorus insecticides. *Anal. Chim. Acta.*, 464, 171-180.
- Dr Artaud** M. (2008). L'Olivier ; Sa contribution dans la prévention et le traitement du syndrome métabolique. Mémoire.
- Badiou**, A. (2007). Caractérisation Cinétique et Moléculaire du Biomarqueur Acétylcholinestérase chez l'Abeille, *Apis mellifera*. Thèse de doctorat de l'université de Paul Cézanne.

Références bibliographiques

- Baco, E.** (2011). Synthèse d'haptènes de phycotoxines pour l'élaboration d'un immunocapteur. Thèse de doctorat de l'université Bordeaux I.
- Ballantyne, B.** et Marrs T. C. (1992). Overview of the biological and clinical aspects of organophosphates and carbamates. In Clinical and Experimental Toxicology of Organophosphates and Carbamates (B. Ballantyne and T. C. Marrs, eds.), pp. 3-14, Butterworth-Heinemann, Oxford.
- Barthelmebs, L.; Hayat, A.; Wis, A.; Marty, J.-L.; Noguer, T.** (2011) Electrochemical DNA aptamer-based biosensor for OTA detection, using superparamagnetic nanoparticles. *Sens. Actuators B Chem.*, 156, 932–937.
- Bavcon Kralj, M., Trebše, P., Franko, M.** (2006). Oxidation as a Pre-step in Determination of Organophosphorus Compounds by the AChE-TLS Bioassay. *Acta. Chim. Slov.*, 53, 43–51.
- Besombes, J.L.** (1994). Thèse de Doctorat de l'Université de Savoie, spécialité chimie.
- Bocquené, G, Galgani F, Walker C.H.** (1997). Les cholinesterases, biomarqueurs deneurotoxicité. In: Biomarqueurs en Ecotoxicologie: Aspects Fondamentaux. Masson, Paris. pp. 209-/240.
- Bratov, A., Abramova N., Munor J., Carlos Domínguez, Alegret S., and Bartrolí J.** (1995). Photocurable polymer matrices for potassium-sensitive ion selective electrode. *Anal. Chem.*, 67, 3589- 3595.
- Chassard-Bouchaud, C.** (1995). l'écotoxicologie, ed. P.u.d. France. paris.
- Claude, B.** (2007). Intérêt des polymères à empreintes moléculaires pour la préparation d'échantillons par extraction solide-liquide. Thèse de doctorat de l'université d'Orléans.
- Cohen S. D.** (1984). Mechanisms of toxicological interactions involving organophosphate insecticide. *Fund. Appl. Toxicol.* 4, 315-324.

Références bibliographiques

- Coulet, P.R.**, (1991). What is a Biosensor?. In : Biosensor principles and applications, Blum L.J., Coulet P.R., Eds., Dekker M., 1-6.
- Communiqué De presse.** (2012). La consommation d'huile d'olive en France Une tendance en expansion. Campagne financée grâce à l'aide de l'union européenne et de l'Espagne.
- Dejous, C.**, (2005) Contribution à l'étude de microcapteurs à ondes acoustiques visant la biodétection rapide sur site. Université Bordeaux 1. p. 126.
- DPV**, direction de la production végétale. (2009). Département lié au ministère de l'agriculture, Rabat, Maroc.
- Ebelmen, J. J.** (1844). Sur les éthers siliciliques. C. R. Acad. Sci. 19, 398-400.
- Eldefrawi A. T.** (1985). Acetylcholinesterases and anticholinesterases. In Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology (G. A. Kerkut and L. I. Gilbert, eds.), pp. 115-130. Pergamon Press, Oxford.
- Elisabeth, L.** (2008). Matériaux mésomorphes à empreinte moléculaire pour le développement d'un capteur de pesticides. Thèse de doctorat de l'Université Toulouse III - Paul Sabatier
- Ellman, G.L.**, Courtney, K.D., Andres, V., Featherstone, R.M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem. Pharmacol., 7, 88-95.
- Fabry, P.**, Fouletier, J. (2003). Microcapteurs chimiques et biologiques application en milieu liquide, Lavoisier.
- Floesser-Mueller, H.** and Swack W. (2001). Photochemistry of organophosphorus insecticides. Rev. Environ. Contam. Toxicol., 172, 129-228.
- Fournier, J.** (1988). Chimie des pesticides, Cultures et Techniques, Nantes.

Références bibliographiques

- Gallivan J. P.** et Dougherty D. A. (1999). Cation-pi interactions in structural biology. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 9459-64.
- Guedri, H.** (2010). Mise au point de biocapteurs basés sur la mesure d'activités enzymatiques de cellules algales pour la surveillance des milieux aquatiques. Thèse de doctorat de l'Institut National des Sciences Appliquées de Lyon.
- Hamd W.** (2009). Elaboration par voie sol-gel et étude microstructurale de gels et de couches minces de SnO₂. Thèse de doctorat de l'Université de Limoges.
- Helali, S.** (2005). Conception et réalisation de matériaux biofonctionnels pour des dispositifs capteurs impedimétriques. Thèse de doctorat de L'école Centrale de Lyon.
- Hendry, S.P.**, Higgins I.J., Bannister J.V. (1990). Amperometric biosensors. J. Biotechnol., 15, 229-238.
- Istamboulie, G.** (2009). Biocapteur associant l'acétylcholinestérase et la phosphotriestérase pour un contrôle environnemental des insecticides organophosphorés. Thèse de doctorat de l'université de Perpignan.
- Kryger, G.**, Silman I., Sussman J. L. (1999). Structure of acetylcholinesterase complexed with E2020 (Aricept®): implications for the design of new anti-Alzheimer drugs. Structure, 7, 297-307.
- Laurent, E.** (2008). Matériaux mésomorphes à empreinte moléculaire pour le développement d'un capteur de pesticides. Thèse de doctorat de l'Université Toulouse III - Paul Sabatier.
- Lotti, M.**, (1995). Cholinesterase inhibition: complexities in interpretation. Clin. Chem., vol. 41 no. 12 1814-1818.

Références bibliographiques

- MAI, A.T.** (2004). Développement des biocapteurs électrochimiques a base de tyrosinase pour la détection des polluants organiques en phase aqueuse.
- MAMVA.** (1996). Ministère de l'Agriculture, de l'Equipement et de l'Environnement Plan d'action oléicole. Division de la production végétale, pp 45-50.
- Marcel V., Palacios L.G., Pertuy C., Masson P., Fournier D.** (1998). Two invertebrate acetylcholinesterase show activation followed by inhibition with substrate concentration. Biochem. J., 329, 329-334.
- Martorell, D., Cespedes, F., Martinez-Fabregas, Alegret, S.** (1994). Amperometric determination of pesticides using a biosensor based on a polishable graphite-epoxy biocomposite. Anal. Chim. Acta., 290, 343-348.
- Matozzo V, Tomei A, Marin M.G.** (2005). Acetylcholinesterase as a biomarker of exposure to neurotoxic compounds in the clam *Tapes philippinarum* from the Lagoon of Venice. Mar. Pollut. Bull. 50: 1686–1693.
- Ménager, M.** (2007). Photodégradation de pesticides organophosphorés en solution aqueuse et sur argiles : Etude mécanistique. Thèse de doctorat de l'université Blaise Pascal.
- Merhi, M.** (2008). Etude de l'impact de l'exposition à des mélanges de pesticides à faibles doses: caractérisation des effets sur des lignées cellulaires humaines et sur le système hématopoïétique murin. Thèse de doctorat de l'Institut National Polytechnique de Toulouse.
- Minh, C.T.,** (1991). Les biocapteurs : principes, construction et applications. Paris: Masson. 158.

Références bibliographiques

- Moll**, N., (2007), Étude et réalisation d'un système immunocapteurs à ondes de Love : application à la détection de toxines, de virus ou de bactéries. Thèse de doctorat de L'Université Bordeaux 1.
- Fabry**, P., Fouletier, J. (2003). Microcapteurs chimiques et biologiques application en milieu liquide, Lavoisier,
- Quinn**, D. (1987). Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states. *Chemical Reviews*, 5, 955-979.
- Remy**, M.H., Frobert Y., Grassi J. (1995). Characterization of monoclonal antibodies that strongly inhibit *Electrophorus electricus* acetylcholinesterase. *J. Biochem.*, 231, 651-658
- Rossi**, L.M.; Quach, A.D.; Rosenzweig, Z. (2004). Glucose oxidase-magnetite nanoparticles biconjugate for glucose sensing. *Anal. Bioanal. Chem.*, 380, 606–613.
- Rosenberry** T. L. (1975). Acetylcholinesterase. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 43, 103-218.
- Ryan**, D. L., Fukuto, T. R. (1985). The effect of impurities on the toxicokinetics of malathion in rats. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 23, 413-424.
- Spivak**, D., Gilmore, M.A., Shea, K.J. (1997). Evaluation of binding and origins of specificity of 9-ethyladenine imprinted polymers. *J.Am.Chem.Soc.*, 119, 4388-4393.
- Sussman**, J. L., Harel M., Frolow F., Oefner C., Goldman A., Toker L. et Silman I. (1991). Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science*. 253, 872-9.
- Taylor**, R. (1991). Protein immobilization, fundamentals and applications. ED. By Taylor F.R., Marcel Dekker, INC, New York (USA).

Références bibliographiques

- Turner, A.P.F.** (1998). Amperometric biosensors based on mediator-modified electrodes. In “Methods in enzymology”. Academic Press Inc., 137, 259-270.
- Umetsu, N.**, Grose F. H., Allahyari R., Abu-El-Haj S., Fukuto, T. R. (1977) Effect of impurities on the mammalian toxicity of technical malathion and acephate. *J. Agric. Food Chem.* 4, 946-953.
- Valdés-Ramírez, G.**, Cortina, M., Ramírez-Silva, M-T., Marty, J-L. (2008). Acetylcholinesterase-based biosensors for quantification of carbofuran, carbaryl, methylparaoxon, and dichlorvos in 5% acetonitrile. *Anal. Bioanal. Chem.*, 392, 699–707.
- Veillet, S.** (2010). Enrichissement nutritionnel de l'huile d'olive : Entre Tradition et Innovation. Thèse de doctorat de l'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse.
- Velasco-Garcia, M. N.** (2009). Seminars in Cell & Developmental Biology, 20, 27-33.
- Walali Loudiyi D.**, Chimi H., Loussert R., Mahou A., Boulouha A. (1984). Caractères morphologiques et physiologiques de clones d'olive « picholine marocaine ». *Olivae*. 3,26-31.
- Wan, K.**, Chovelon J.M., Jaffrezic-Renault N. and Soldatkin A.P. (1999). Sensitive detection of pesticide using ENFET with enzymes immobilized by cross-linking and entrapment method. *Sens. Actuators, B.*, 58399-408.
- Worek F.**, Eyer P., Szinicz L., Thiermann H. (2005). Evaluation of oxime efficacy in nerve poisoning: Development of a kinetic-based dynamic model. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 209, 193-202.
- Worek F.**, Thiermann H., Szinicz L., Eyer P. (2004). Kinetic analysis of interactions between human acetylcholinesterase, structurally different organophosphorus compounds and oximes. *Biochem. Pharmacol.*, 68, 2237-2248.

ANNEXES

Article

Acetylcholinesterase Immobilized on Magnetic Beads for Pesticides Detection: Application to Olive Oil Analysis

Najwa Ben Oujji ^{1,2}, Idriss Bakas ^{1,2}, Georges Istamboulié ¹, Ihya Ait-Ichou ², Elhabib Ait-Addi ², Régis Rouillon ¹ and Thierry Noguer ^{1,*}

¹ IMAGES Laboratory, University of Perpignan, IMAGES EA4218, Building S 52 Av Paul Alduy, 66860 Perpignan Cedex, France; E-Mails: najwa_benoujji@hotmail.com (N.B.O.); idriss_salame@hotmail.com (I.B.); gistamboulie@yahoo.fr (G.I.); rouillon@univ-perp.fr (R.R.)

² AQUAMAR Laboratory, Photocatalysis and Environment Team, Department of Chemistry, Faculty of Science, University Ibn Zohr, BP 8106 Cité Dakhla, Agadir, Morocco; E-Mails: ihya.aitichou@gmail.com (I.A.-I.); h.aitaddi@esta.ac.ma (E.A.-A.)

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: noguer@univ-perp.fr; Tel.: +33-4-68-66-22-55; Fax: +33-4-68-66-22-23.

Received: 4 May 2012; in revised form: 24 May 2012 / Accepted: 4 June 2012 /

Published: 8 June 2012

Abstract: This work presents the development of bioassays and biosensors for the detection of insecticides widely used in the treatment of olive trees. The systems are based on the covalent immobilisation of acetylcholinesterase on magnetic microbeads using either colorimetry or amperometry as detection technique. The magnetic beads were immobilised on screen-printed electrodes or microtitration plates and tested using standard solutions and real samples. The developed devices showed good analytical performances with limits of detection much lower than the maximum residue limit tolerated by international regulations, as well as a good reproducibility and stability.

Keywords: electric eel acetylcholinesterase; organophosphorus insecticides; magnetic microbeads; olive oil

1. Introduction

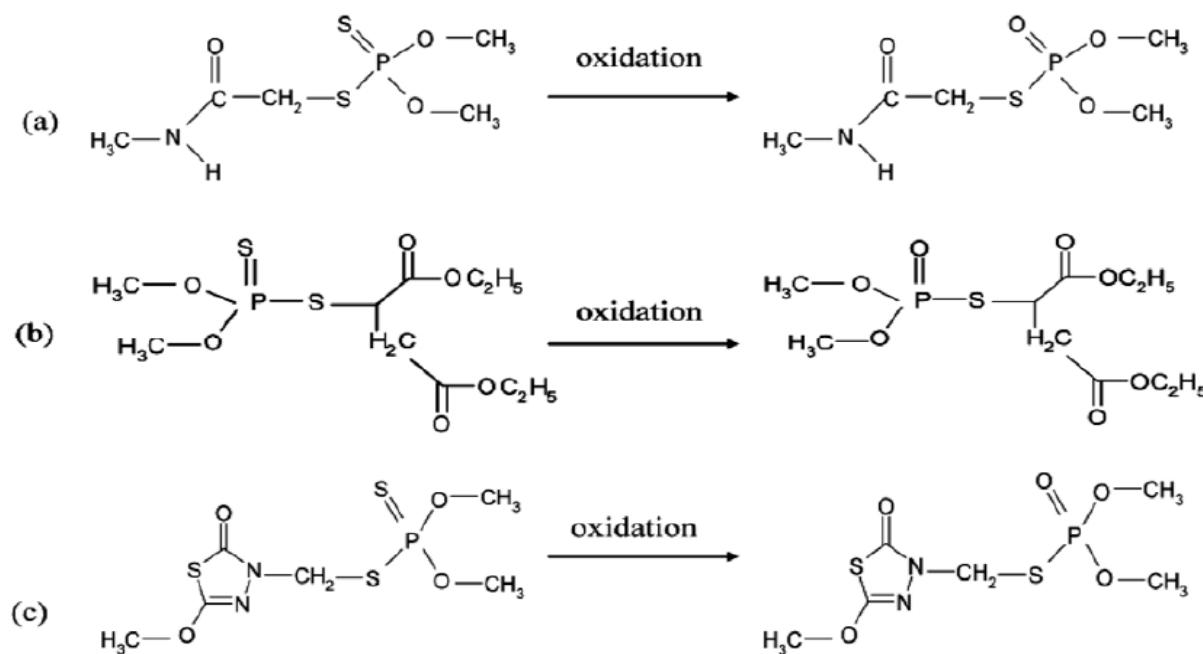
Olive cultivation is widespread throughout the Mediterranean region and is important for the rural economy, local heritage and environment [1]. To ensure crop protection, the use of pesticides is often

required for blocking attacks of pests and diseases, as well as presence of weeds. The olive fruit fly *Bactrocera oleae* is the most serious pest of olives in the Mediterranean countries, causing economic losses reaching up to 15% of olive production [2]. Insecticide treatments are applied every year to control the fly population, mainly based on pesticides belonging to the organophosphates class. These chemicals can persist to the harvest stage and are likely to contaminate olive oil. Therefore, both European Union and the Codex Alimentarius Commission of the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) have established maximum pesticide residues limits (MRLs) for olives and olive oil [3,4].

Conventional methods of detection of organophosphate pesticides rely on an analysis by gas chromatography with specific detection. Although these techniques are very powerful and can detect very low concentrations, they are still very expensive and require highly skilled personnel, expensive purification steps and specialized major equipment [5]. In the last decades, new technologies based on biological detection systems have emerged. Among these techniques, biosensors have been shown to be very promising due to their simplicity and cost effectiveness compared to conventional techniques. Biosensors based on the inhibition of acetylcholinesterase (AChE) have been intensively studied in the aim of detecting organophosphorus insecticides [6]. Cholinesterases are important enzymes present in vertebrates and insects, which hydrolyze the neurotransmitter acetylcholine in the nervous system [7]. Organophosphorus pesticides are esters, amides or thiol derivatives of phosphoric acid esters. They primarily exist in the thionate form which is stable, but not very active. Activation occurs during metabolic oxidation into the biologically active oxon form, which is much less stable [8]. These insecticides act by phosphorylation of the serine located in the catalytic site of AChE, they can be considered as pseudo-substrates [9]. As this phosphorylation is very difficult to reverse, organophosphates are considered as irreversible inhibitors. This irreversibility is probably the main problem related to AChE-based biosensors, because of the difficulty in performing multiple assays using the same sensor [6]. Several methods have been investigated to overcome this problem, including mainly reactivation using oximes [10] and original immobilisation techniques.

Among these immobilisation methods, magnetic particles have recently gained a great attention due to their potential for providing control of electrochemical processes [11] and creating magneto-switchable devices [12,13]. Immobilization of enzymes, antibodies, oligonucleotides, and other biologically active compounds onto magnetic nanoparticles platforms is a key element in using these structures for biosensing purposes. Fabricating biofunctionalized magnetic materials containing a high amount of the biological element with high activity and stability is essential for the design of robust sensors that take advantage of the magnetic capabilities. The different routes for the fabrication of biofunctionalized magnetic nanoparticles include traditional methods such as covalent binding, adsorption, specific affinity interactions, and entrapment in porous surface layers [14]. Immobilisation of acetylcholinesterase on magnetic microbeads was already described in the literature, based on nickel-histidine affinity [6,15]. In this work we propose an immobilisation method that can be applied to the native acetylcholinesterase from electric eel, based on covalent coupling on magnetic microbeads. This method allows designing cheaper biosensors allowing the detection of insecticides in olive oil (Figure 1). The modified beads have been used either in bioassay or in biosensor configurations, based respectively on spectrophotometric or amperometric detection methods.

Figure 1. Structures of organophosphates and their oxidized forms used in this study: (a) dimethoate and his oxon form omethoate; (b) malathion and malaoxon; (c) methidathion and methidathion oxide.



2. Experimental Section

2.1. Chemicals and Stock Solutions

AChE (EC 3.1.1.7) from electric eel (EE) (Type V-S, 1,000 U/mg) was purchased from Sigma-Aldrich (St Quentin-Fallavier, France). Acetylthiocholine chloride (ATChCl), acetylthiocholine iodide (ATChI) and 5,5-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB-Ellman's reagent) were provided by Sigma. In order to minimize hydrolysis, ATChCl and ATChI solutions were prepared daily in 0.9% NaCl (Sigma-Aldrich) solution. Stock solutions of enzymes and DTNB were prepared in 0.1 M phosphate buffer ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, Sigma-Aldrich) at pH 7. The organophosphorus insecticides malaoxon, omethoate and methidathion were purchased from Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany). Pesticide stock solutions (concentration 10^{-3} M) were prepared in acetonitrile (Sigma) and stored at 4 °C, working pesticide solutions were prepared daily in distilled water by dilution of the stock solution. The oxidation of methidathion was achieved using N-bromosuccinimide provided by Sigma-Aldrich. The glutaraldehyde used for activation of magnetic beads was also purchased from Sigma-Aldrich. Carbon (Electrodag 423SS) and silver/silver chloride (Electrodag 418SS) inks were obtained from Acheson (Plymouth, UK). Cobalt phtalocyanine-modified carbon paste was purchased from Gwent Electronic Materials, Ltd. (Gwent, UK). Poly(vinyl)chloride (PVC) sheets (200 mm × 100 mm × 0.5 mm), supplied by SKK (Denzlingen, Germany), were used as support for the screen-printed electrodes. A glycerophthalic paint (Astral, France) was used as insulating layer.

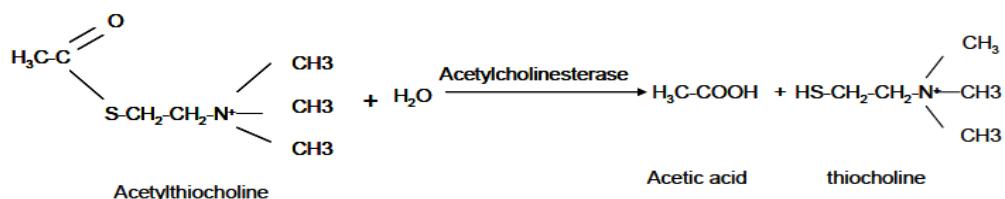
2.2. Apparatus

Spectrophotometric measurements were performed using a Hewlett Packard diode array 8451A spectrophotometer. Colorimetric measurements on PS-microtiter plates, U form (Greiner, Germany) were performed with a Labsystems Multiskan EX microtiter plate reader (Thermo Life Sciences, France). Amperometric measurements were carried out with a 641VA potentiostat (Metrohm, Switzerland), connected to a BD40 (Kipp & Zonen, The Netherlands) flatbed recorder.

Screen-printed electrodes were produced using a semi-automatic DEK248 printing machine according to a procedure previously described [15], but in a three-electrode configuration. The working electrode was a 4 mm-diameter disk, the auxiliary electrode was a 16 mm × 1.5 mm curved line and the Ag/AgCl pseudo-reference electrode was a 5 mm × 1.5 mm straight track. For experiments with magnetic beads, a small 4 mm-diameter magnet was placed on the backside of the working electrode to magnetically attach the enzyme-functionalised beads to the electrode surface.

2.3. Determination of Acetylcholinesterase Activity

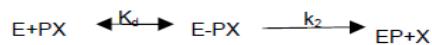
The activity of AChE was measured spectrophotometrically by monitoring at 412 nm the appearance of thionitrobenzoate resulting from the reaction of DTNB with thiocholine, the product of the enzymatic hydrolysis of acetylthiocholine substrate, according to the procedure described by Ellman *et al.* [16]. This method is based on the use of a synthetic substrate: acetylthiocholine, whose hydrolysis liberates thiocholine and acetic acid according to the reaction:



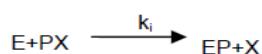
The thiocholine reacts with 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) yielding a yellow complex absorbing at 412 nm ($\epsilon = 1.36 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

2.4. Determination of the Inhibition Constant k_i

The mechanism of inhibition of AChE by organophosphate compounds is well-known [17]. The inhibitor phosphorylates a serine located in the active site and the inhibition can be considered as irreversible in the first 30 min [18]:



With E = enzyme, PX = organophosphate and X = leaving group. This scheme can be simplified with the bimolecular constant $k_i = k_2/K_d$:



To follow the inhibition, the enzyme was incubated with the pesticide during different periods of time, at 30 °C in 0.1 M phosphate buffer, pH 7. The change in remaining free enzyme concentration $[E]/[E_0]$ with time was estimated by sampling aliquots at various times and recording the remaining activity in the presence of 1 mM acetylthiocholine [19].

The experimental procedure was as follows: 300 μL of 2.5×10^{-3} M DTNB and 100 μL of 0.01 M ATChI were added to 500 μL of 0.1 M phosphate buffer at pH 7; then 100 μL of the enzyme-inhibitor solution were taken at fixed time intervals and added to the cell. The incubation times used to study EE-AChE inhibition were 0, 1, 3, 5, 7, 10, 15 and 20 min.

The residual activity of AChE was calculated by comparing the slope of obtained kinetics before and after inhibition. The graphs obtained by plotting log of residual activity vs. incubation time for each inhibitor showed a linear representation. The apparent reaction rate k_{obs} (min^{-1}) were obtained by measuring the slope of this straight line. Plotting $1/k_{\text{obs}}$ vs. $1/[I]$ allowed calculating the inhibition constant k_i , which corresponds to the reciprocal value of the obtained slope.

2.5. Immobilisation on Magnetic Nanoparticles by Covalent Coupling

Nickel magnetic beads with a diameter of 200 nm were activated according to the following steps [20]:

- (1) Oxidation of the beads: 60 mg of magnetic beads were stirred for 4 h in 1 mL of 0.5 M sulfuric acid, and then washed twice with distilled water.
- (2) Functionalization with an amine group: 70 μL of 3-aminopropyltriethoxysilane were added to the beads previously poured in 100 mL of ethanol and ultrasonicated during 5 min, the suspension was kept under mechanical stirring overnight and finally washed three times with ethanol and twice with distilled water.
- (3) Covalent coupling with glutaraldehyde: 30 μL of aminated beads were washed twice with 1 mL of 0.1 M pH 7 buffer. 820 μL of buffer, 100 μL of electric eel AChE (4.41 UI/mL) and 80 μL of a 25% glutaraldehyde solution were added to the beads and stirred during 30 min at room temperature.
- (4) 1 μL of the obtained enzyme-linked beads suspension was placed either on the surface of the working electrode, beforehand fitted with a 4 mm-diameter magnet (amperometric detection), or in each well of the microplate (colorimetric detection).

2.6. Measurements

2.6.1. Amperometric Measurements

The electrode was vertically immersed in a thermostated cell (30 °C) containing 10 mL phosphate buffer pH 7 under constant magnetic stirring (417 rpm). The applied potential was 100 mV vs. Ag/AgCl reference electrode, using cobalt phtalocyanine as mediator. The current intensity was recorded and, after current stabilisation, 1 mM ATCh (final concentration) was added in the cell. The measured signal corresponded to the difference of current intensity between the baseline and the plateau. The cell was washed with distilled water between measurements.

The pesticide detection was made in a three-step procedure as follows: first, the initial response of the electrode to 1 mM ATCh was recorded three times, then the electrode was incubated in a solution

containing a known concentration of insecticide, and finally the residual response of the electrode was recorded again. Electrodes were thoroughly washed with distilled water between each measurement. The percentage of the inhibition was correlated with the insecticide concentration, the inhibition rate was calculated according to the following formula: $I (\%) = [(I_0 - I)/I_0]100$, I and I_0 being respectively the current after the and before inhibition.

2.6.2. Colorimetric Measurements

Two hundred μL of phosphate buffer pH 8 were added in each well containing AChE-modified magnetic beads suspension in order to equilibrate the enzyme. After removal of the liquid using the Adem-Mag96 [21] 200 μL of phosphate buffer containing 2 mM ACTh-I and 6% DTNB were added and the microplate was incubated for 30 min under constant orbital stirring (300 rpm). The absorbance was then measured at 405 nm using 100 μL of the solution taken from each well. Inhibition experiments were performed by incubating the magnetic beads (1 μL) with 100 μL of different concentrations of pesticide during 10 min. The measurement procedure was the same as described above.

2.7. Extraction Procedure

The determination of the three pesticides in natural oil samples was performed after a simple liquid-liquid extraction procedure. The extraction was performed using 10 mL of olive oil previously spiked with pesticides at final concentrations of 10^{-2} M for omethoate and methidathion, and 10^{-3} M for malaoxon. The mixture was heated at 50 °C for 30 min, and 500 μL of this olive oil was added to 400 μL of acetonitrile and 100 μL of dichloromethane. The mixture was centrifuged at 13,400 rpm for 90 s and the resulting supernatant was recovered and used as a pesticide mother solution, other pesticide solutions were prepared by diluting this mother solution.

2.8. Oxidation of Methidathion

In this study we have focused on the detection of oxidized forms of each pesticide, which are less stable but more toxic than the normal forms. The oxidized forms of dimethoate and malathion, respectively called omethoate and malaoxon are commercially available, but in the case of methidathion an oxidation step must be carried out using *N*-bromosuccinimide (NBS). The efficiency of this oxidation step was controlled using reverse-phase HPLC, it was shown that 3×10^{-5} M NBS was sufficient for the total oxidation of a 10^{-5} M methidathion solution. The effect of NBS on AChE was investigated to ensure that the enzyme is not affected by the oxidizing agent, it was shown that in assays conditions NBS did not inhibit AChE.

3. Results and Discussion

3.1. Determination of the Inhibition Constant k_i

The inhibition constants k_i were calculated by performing enzyme kinetic measurements using different pesticide concentrations and by varying the incubation time of the enzyme with the pesticide. The residual enzyme activity was determined according to the Ellman's spectrophotometric method as

described previously. The inhibition constant k_i is proportional to the affinity of the pesticide for the enzyme and its inhibitory power. k_i is therefore a fundamental parameter to compare the inhibitory potency of insecticides and assess the sensitivity of the enzymes studied. The constants k_i presented in Table 1 have been determined by studying the residual activity of the enzyme after contact with different concentrations of inhibitor for a given incubation time. This value of k_i shows that the acetylcholinesterase of electric eel is highly sensitive to malaoxon and methidathion but very weakly sensitive to omethoate.

Table 1. Inhibition constants k_i ($\mu\text{M}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) obtained for methidathion, malaoxon and omethoate.

	Methidathion	Malaoxon	Omethoate
AChE-EE	1.07	2.98	0.001

3.2. Detection of Insecticides in Microplate Assays

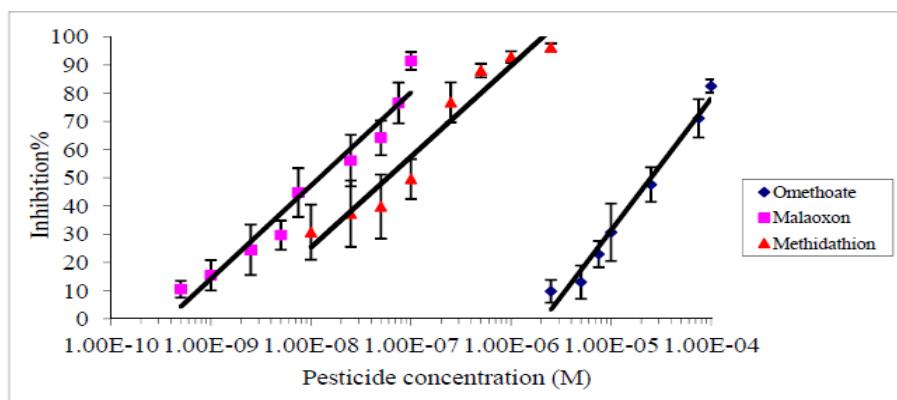
3.2.1. Optimisation of the Reaction Time

The time of reaction of acetylthiocholine with immobilized AChE was studied by measuring every 5 min the appearance of the yellow complex at 412 nm. It was shown that the reaction was completed after 30 min in absence of pesticide; this time was therefore used in inhibition measurements.

3.2.2. Detection of Organophosphates by Colorimetric Method

The inhibition effect of malaoxon, methidathion and omethoate on Electric eel AChE was studied using an incubation time of 10 min and a measurement time of 30 min. Figure 2 shows the inhibition rates obtained with each pesticide as a function of the concentration used.

Figure 2. Inhibition effect of omethoate, methidathion and malaoxon on electric eel AChE immobilized on magnetic beads, measurement by colorimetric method.



As expected from the values of inhibition constants (Table 1), the inhibitory effect of omethoate was the weaker and malaoxon was the more effective inhibitor. The limit of detection (LOD) and the IC₅₀ were calculated as the pesticide concentration inducing respectively 10% and 50% inhibition. The IC₁₀ and IC₅₀ obtained for each pesticide are summarized in Table 2.

Table 2. The IC₅₀ and IC₁₀ values (M) obtained with the two detection methods with the three pesticides.

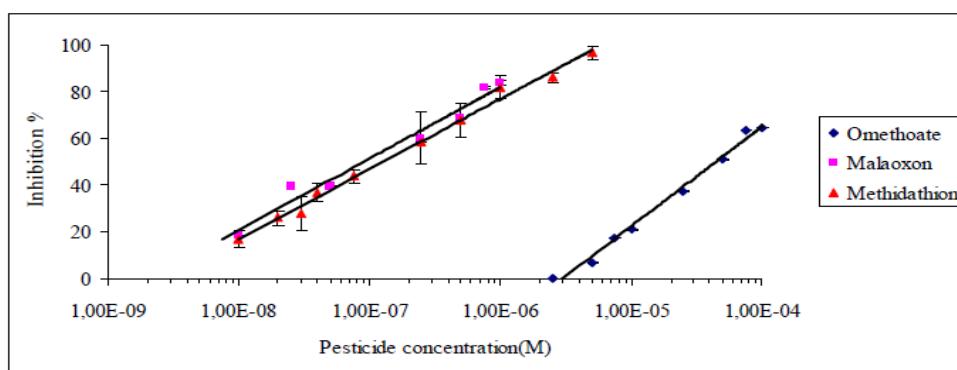
	Colorimetric detection		Amperometric detection	
	Pesticide concentration (M)		Pesticide concentration (M)	
	IC ₁₀	IC ₅₀	IC ₁₀	IC ₅₀
Omethoate	3.45E-06	2.65E-05	5.15E-06	4.46E-05
Methidathion	2.50E-09	5.80E-08	8.85E-09	1.36E-07
Malaoxon	8.00E-10	1.30E-08	9.40E-09	1.00E-07

Beside these results, the microplate assay showed a good reproducibility with a stable response, this detection method has the advantage of saving time as it allows analysing 96 samples in a single assay. Furthermore, due to the small volumes used, it allows one to minimize the use of reagents, however this characteristic can be considered also as a disadvantage because of the difficulty to maintain good reproducibility using small volumes.

3.3. Detection of Organophosphates by an Amperometric Method

The operational stability of biosensors based on AChE covalently bound to magnetic beads was tested to ensure that any decrease in the signal was related to enzyme inactivation and not to enzyme leakage. This parameter was estimated by repetitive measurements of the response of a single electrode to 1 mM ATCh, with intermediate rinses with distilled water. In these conditions, the designed sensors showed a very good stability for at least 10 consecutive measurements with a relative standard deviation (R.S.D) in order of 3% (300 ± 10 nA). The reproducibility of the inhibition was estimated by measuring six times the inhibition percentage by 3×10^{-8} of oxidized methidathion, the R.S.D of the inhibition determination was 4% (217 ± 10).

Figure 3. Inhibition effect of omethoate, methidathion and malaoxon on the amperometric biosensor based on electric eel AChE covalently immobilized on magnetic microbeads.



The incubation time between the biosensor and pesticides was also tested. It was observed that an incubation time of 10 min was sufficient to reach the maximum inhibition rate whatever the pesticide concentration used. This incubation time was thus selected and used for all inhibition assays. Figure 3 presents the inhibition effect of the three pesticides on the biosensor. As expected the biosensor

displays a very low limit of detection for malaoxon and methidathion, while omethoate is detected with a very low sensitivity (Figure 3). The IC_{10} and IC_{50} values obtained for each pesticide are summarized in Table 2.

3.4. Application to Real Samples

The performance of the biosensors was tested using olive oil samples previously spiked with known concentrations of pesticides. In order to measure the efficiency of the extraction procedure, three olive oil samples were spiked to obtain 10^{-2} M of omethoate as final concentration and extracted according to the method described in Section 2.7. The inhibition effect of the resulting extracts was measured after dilution in the working buffer, at a final concentration of 10^{-4} M. In these conditions, the average response of the sensors was 75 ± 7 nA, showing a good reproducibility of the extraction method. The recovery percentage for the three pesticides was calculated using the formula below:

$$\text{Recovery\%} = \% \text{ of inhibition in real samples} / \% \text{ of inhibition in buffer} \times 100$$

It was found that the recovery percentage for the three pesticides with both methods varies from 40% to 170%, as shown in Figures 4 and 5. The results showed a very satisfying correlation whatever the format used, *i.e.*, microplate assay (Figure 4) or biosensor (Figure 5).

Figure 4. Comparison of inhibition effects of omethoate, methidathion and malaoxon in olive oil real samples and buffer, detection by optical method.

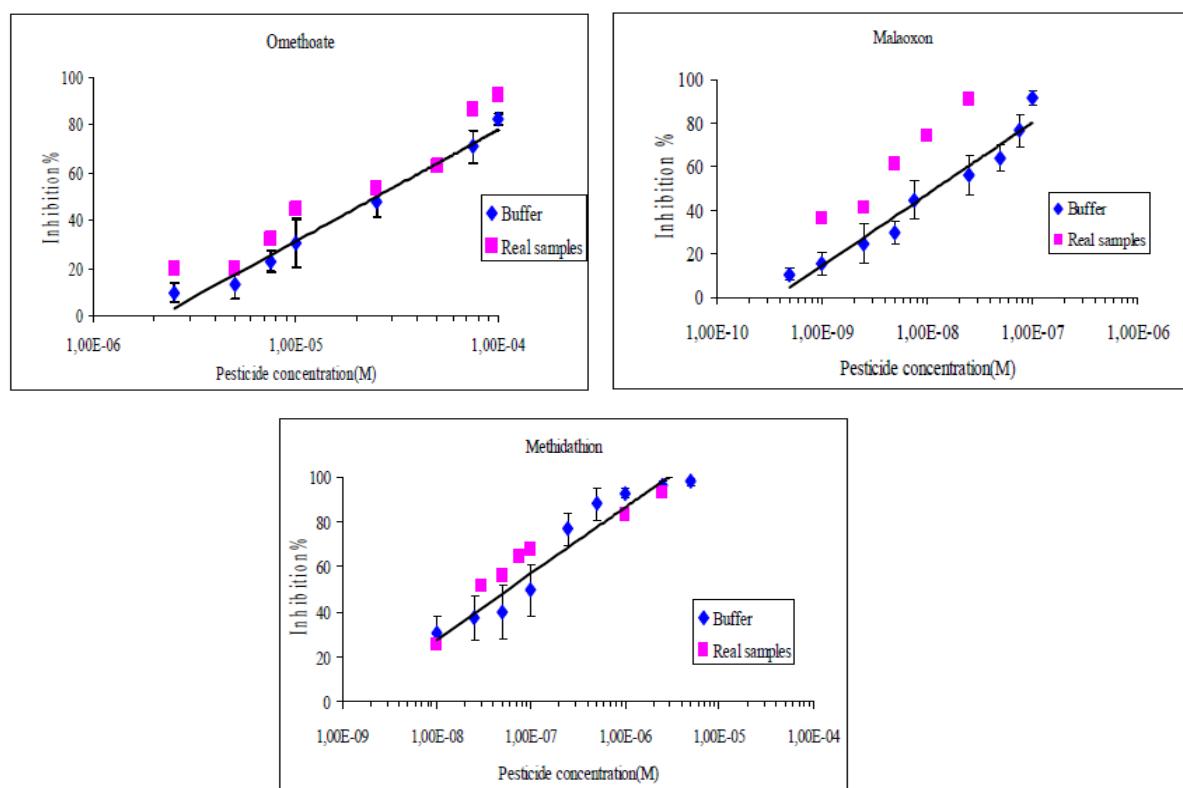
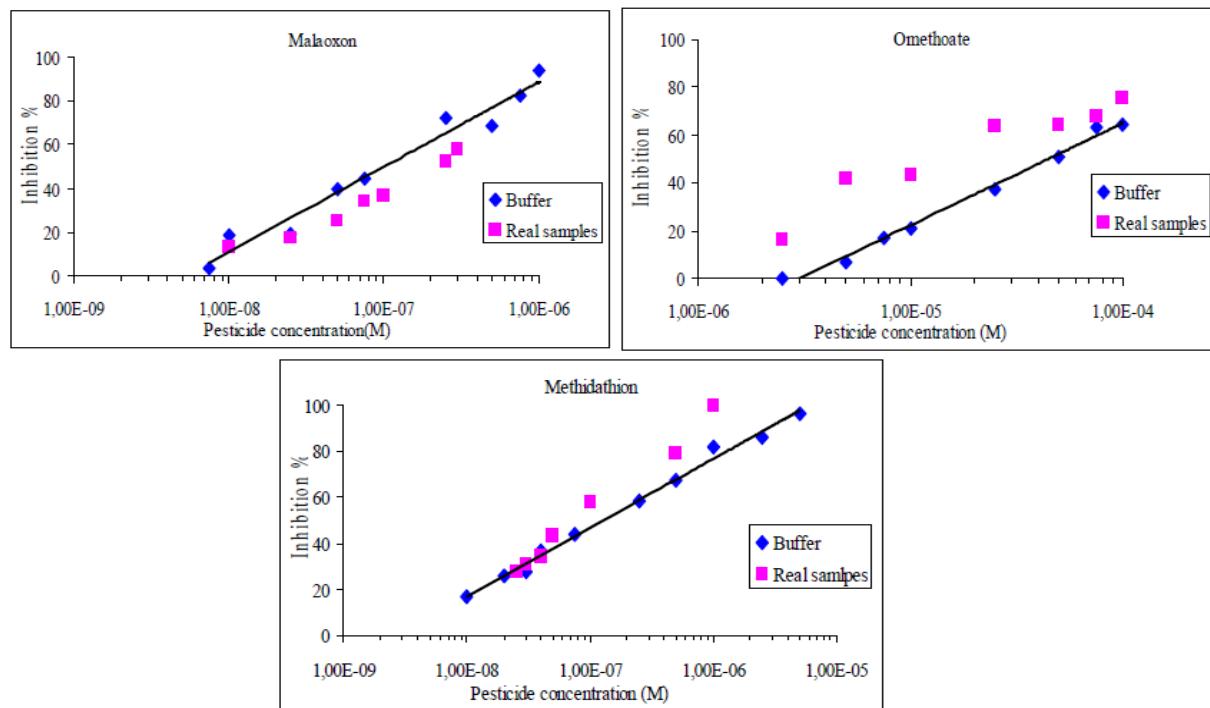


Figure 5. Comparison of inhibition effects of omethoate, methidathion and malaoxon in buffer or olive oil real samples, detection by amperometric method.



Despite that, a small increase of the inhibition effect was observed whatever the pesticide studied, especially when using the microplate assay. These small discrepancies could be attributed to matrix effects. In order to evaluate these interferences, a blank assay was carried out using an olive oil sample that was previously extracted and then spiked to obtain 10^{-2} M of omethoate. It was found that the matrix effect was responsible of a 5.5% supplementary loss of the sensor response, which can explain the increase in inhibition ratios observed using real samples. Additional blank assays were performed to verify that the inhibition was not due to pesticides already present in the olive oil, these tests showed very low inhibition rates, lower than 4%. The inhibition effect of olive oil samples containing NBS has also been studied, it was shown that NBS did not affect the measurement.

4. Conclusions/Outlook

In this work we have developed and optimised the immobilisation of acetylcholinesterase on magnetic microbeads by covalent coupling. The modified beads have been used in two configurations, using either microplates or screen-printed electrodes supports. Depending on the configuration, colorimetry or amperometry have been applied as detection methods and the devices have been tested on standard and real samples for the determination of three pesticides commonly used for the treatment of olive trees: omethoate, malaoxon and methidathion. The results showed a good performance of the developed devices with reasonable limits of detection, as well as good reproducibility and stability. These last two criteria were however weaker for the colorimetric method due to the difficulty in

handling small volumes in the microplate assay. On the other hand, this configuration had the advantage of being faster and more economical. This study highlighted the low sensitivity of the electric eel acetylcholinesterase for omethoate compared to malaoxon and oxidized methidathion, which lead to detection limits as low as 10^{-10} M. The application on the spiked olive oil samples showed very satisfactory results, comparable with those obtained using standard solutions.

Acknowledgments

Ben Oujji Najwa would like to express gratitude to the Averroes Programme (EC programme Erasmus Mundus, Action 2) for financially supporting this work.

References

1. Kandylis, P.; Vekiari, A.S.; Kanellaki, M.; Grati, K.; Msallem, M.; Kourkoutas, Y. Comparative study of extra virgin olive oil flavor profile of Koroneiki variety (*Olea europaea* var. *Microcarpa alba*) cultivated in Greece and Tunisia during one period of harvesting. *LWT-Food Sci. Technol.* **2011**, *44*, 1333–1341.
2. Mazomenos, B.E.; Pantazi-Mazomenou, A.; Stefanou, D. Attract and kill of the olive fruit fly *Bactrocera oleae* in Greece as a part of an integrated control system. *IOBC - WPRS Bull.* **2002**, *25*, 137–146.
3. Luchetti, F. Importance and future of olive oil in the world market—An introduction to olive oil. *Eur. Lipid J. Sci. Technol.* **2002**, *104*, 559–563.
4. Lentza-Rizos, C.; Avramides, E.J. Pesticide residues in olive oil. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **1995**, *141*, 111–134.
5. Istamboulie, G.; Cortina-Puig, M.; Marty, J.-L.; Noguer, T. The use of Artificial Neural Networks for the selective detection of two organophosphate insecticides: Chlorpyrifos and chlorgenvinfos. *Talanta* **2009**, *79*, 507–511.
6. Istamboulie, G.; Andreescu, S.; Marty, J.L.; Noguer, T. Highly sensitive detection of organophosphorus insecticides using magnetic microbeads and genetically engineered acetylcholinesterase. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *23*, 506–512.
7. Fest, C.; Schmidt, K.-J. References. In *The Chemistry of Organophosphorus Pesticides, Reactivity, Synthesis, Mode of Action, Toxicology*; Springer-Verlag Heidelberg: New York, NY, USA, 1973; pp. 122–124.
8. Ballantyne, B.; Marrs, T.C. Overview of the Biological and Clinical Aspects of Organophosphates and Carbamates. In *Clinical and Experimental Toxicology of Organophosphates and Carbamates*; Ballantyne, B., Marrs, T.C., Eds.; Butterworth-Heinemann Elsevier Ltd.: Oxford, UK, 1992; pp. 3–14.
9. Eldefrawi, A.T. References. In *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*; Kerkut, G.A., Gilbert, L.I., Eds.; Pergamon Press: Oxford, UK, 1985; pp. 115–130.
10. Gulla, K.C.; Gouda, M.D.; Thakur, M.S.; Karanth, N.G. Reactivation of immobilized acetylcholinesterase in an amperometric biosensor for organophosphorus pesticide. *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1597*, 133–139.

11. Wang, J.; Musameh, M.; Laocharoensuk, R. Magnetic catalytic nickel particles for on-demand control of electrocatalytic processes. *Electrochim. Commun.* **2005**, *7*, 652–656.
12. Katz, E.; Willner, I. Magneto-stimulated hydrodynamic control of electrocatalytic and bioelectrocatalytic processes. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *124*, 10290–10291.
13. Katz, E.; Baron, R.; Willner, I. Magnetoswitchable electrochemistry gated by alkyl-chainfunctionalized magnetic nanoparticles: Controlling of diffusional and surface-confined electrochemical process. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 4060–4070.
14. Stanciu, L.; Won, Y.-H.; Ganesana, M.; Andreeșcu, S. Magnetic particle-based hybrid platforms for bioanalytical sensors. *Sensors* **2009**, *9*, 2976–2999.
15. Andreeșcu, S.; Barthelmebs, L.; Marty, J.-L. Immobilisation of AChE on screen-printed electrodes: Comparative study between three immobilisation methods; Applications to the detection of organophosphorus insecticides. *Anal. Chim. Acta* **2002**, *464*, 171–180.
16. Ellman, G.L.; Courtney, K.D.; Andres, V.; Featherstone, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharm.* **1961**, *7*, 88–95.
17. Aldridge, W.N. Some properties of specific cholinesterases with particular reference to the mechanism of inhibition by diethyl p-nitrophenyl thiophosphate (E605) and analogues. *Biochem. J.* **1950**, *46*, 451–456.
18. Boublik, Y.; Saint-Aguet, P.; Lougarre, A.; Arnaud, M.; Villatte, F.; Estrada-Mondaca S. Acetylcholinesterase engineering for detection of insecticide residues. *Protein Eng.* **2002**, *15*, 43–50.
19. Rhouati, A.; Istamboulie, G.; Cortina-Puig, M.; Marty, J.L.; Noguer, T. Selective spectrophotometric detection of insecticides using cholinesterases, phosphotriesterase and chemometric analysis. *Enzyme Microb. Technol.* **2010**, *46*, 212–216.
20. Rossi, L.M.; Quach, A.D.; Rosenzweig, Z. Glucose oxidase-magnetite nanoparticles biconjugate for glucose sensing. *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, *380*, 606–613.
21. Barthelmebs, L.; Hayat, A.; Wis, A.; Marty, J.-L.; Noguer, T. Electrochemical DNA aptamer-based biosensor for OTA detection, using superparamagnetic nanoparticles. *Sens. Actuators B Chem.* **2011**, *156*, 932–937.

© 2012 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).



Sol-gel immobilization of acetylcholinesterase for the determination of organophosphate pesticides in olive oil with biosensors

Najwa Ben Oujji^{a,b}, Idriss Bakas^{a,b}, Georges Istamboulié^a, Ihya Ait-Ichou^b, Elhabib Ait-Addi^b, Régis Rouillon^a, Thierry Noguer^{a,*}

^a University of Perpignan, IMAGES EA 4218, Building S 52 Av Paul Alduy, 66860 Perpignan Cedex, France

^b University Ibn Zohr, AQUAMAR, Photocatalysis and Environment Team, Chemistry Department, Faculty of Science, BP 8106 Cité Dakhla, Agadir, Morocco

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 July 2012

Received in revised form

31 August 2012

Accepted 3 September 2012

Keywords:

Electric eel acetylcholinesterase

Organophosphorus insecticides

Sol-gel

Amperometric biosensors

Olive oil

Screen-printed electrodes

ABSTRACT

This paper presents the construction of amperometric biosensors for the detection of organophosphorus insecticides widely used in the treatment of olive trees. The systems are based on the immobilisation of acetylcholinesterase on screen-printed electrodes by bioencapsulation in a sol-gel composite. The enzyme activity was estimated by measuring the thiocholine produced by the enzymatic hydrolysis of the acetylthiocholine chloride using cobalt phthalocyanine as mediator. The developed devices have been used to carry out inhibition studies with three pesticides: malathion, methidathion and dimethoate (in their oxidized form), and tested using standard solutions and real samples of olive oil. These biosensors showed good operational stability as they maintained their initial analytical signal response during 10 successive measurements, and a good reproducibility with a relative standard deviation of 3%. The limits of detection of the developed devices were very compatible with the maximum residue limit tolerated by international regulations, they were as low as 10^{-9} M for the widely used pesticide malaoxon (oxidized malathion). The developed sensors were successfully used for the determinations of insecticides in real samples of olive oil.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The extensive use of organophosphorus and carbamate insecticides in modern agriculture has raised serious public concern regarding the environment and food safety. In the field of olive oil, insecticide treatments are applied every year to control the fly population, mainly based on pesticides belonging to the class of organophosphates. These chemicals allow crop protection of olive trees, however their residues detected in the oil and fruits are a major risk for consumer health. Therefore, both European Union and the Codex Alimentarius Commission of the Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations have established maximum pesticide residues limits (MRLs) for olives and olive oil (Lentza-Rizos & Avramides, 1995; Luchetti, 2002). Concerning the three pesticides used in this study, the MRLs are in order of 0.5 mg/kg for malathion, 2 mg/kg for dimethoate and 1 mg/kg for the methidathion, according to the French Department of Agriculture

and Agri-Food (AF920805) (2012). As for olive oil, these MRLs correspond to molar concentrations ranging from $1.7 \cdot 10^{-6}$ M (malathion) to $9.7 \cdot 10^{-6}$ M (dimethoate).

In the last years, growing attention has been paid to the development of reliable, fast and low cost analytical systems to monitor pesticides from environmental and food industry. Chromatographic techniques (GC, HPLC) generally coupled with UV or MS detectors are currently used as reference methods and allow the detection of a wide range of pollutants with a very high sensitivity, reliability and precision. In spite of their advantages, these techniques require expensive instrumentation and highly trained personnel, are time consuming, and are not easily adapted to in field analysis (Andreasu, Barthélémy, & Marty, 2002). New technologies based on biological detection systems have emerged and can be a good alternative for these classical methods. Among these techniques, biosensors have been shown to be very promising due to their simplicity and cost effectiveness compared to conventional techniques.

Biosensors are analytical devices which tightly combine bio-recognition elements and physical transducers for detection of target compounds. In enzyme-based biosensors, the biological element is the enzyme which reacts selectively with its substrate

* Corresponding author. Tel.: +33 (0) 4 68 66 22 55; fax: +33 (0) 4 68 66 22 23.

E-mail addresses: najwa_benoujji@hotmail.com (N. Ben Oujji), ihya.aitichou@gmail.com (I. Ait-Ichou), noguer@univ-perp.fr (T. Noguer).

(Guilbault, Pravda, & Kreuzer, 2004). Amperometric biosensors based on inhibition of acetylcholinesterase (AChE) activity have been extensively studied to detect the presence of organophosphate pesticides in various kinds of samples (Andreasu & Marty, 2006; Istamboulie, Cortina-Puig, Marty, & Noguer, 2009).

This work describes the development of a cheap, fast and simple amperometric biosensor based on the inhibition of AChE for the detection of three organophosphorus insecticides commonly used for the treatment of olive trees: Malathion, Dimethoate and Methidathion in their oxidized forms (Fig. 1). The sensor was designed for the fast detection of insecticides contained in olive oil after a simple liquid–liquid extraction. Previous works have described the development of amperometric and optical biosensors based on the immobilisation of AChE on magnetic microbeads by covalent coupling which had a good analytical performance with reasonable reproducibility and stability (Ben Oujji et al., 2012). This work aims to enhance the performance of the previously described systems by optimizing the immobilisation procedure of AChE on low-cost screen-printed electrodes using sol–gel entrapment. The general principle of the sensing device is shown in Fig. 2. To our knowledge it is the first description of a sol–gel based biosensor for the detection of these pesticides in olive oil.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and stock solutions

AChE (EC 3.1.1.7) from electric eel (EE) (Type V-S, 1000 U/mg) was purchased from Sigma–Aldrich (St Quentin-Fallavier, France). Acetylthiocholine chloride (Sigma–Aldrich) solutions were prepared daily in 0.9% NaCl (Sigma–Aldrich) in order to minimize hydrolysis. Stock solutions of enzymes were prepared in 0.1 M phosphate buffer ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, Sigma–Aldrich) at pH 7. The organophosphorus insecticides malaoxon, omethoate and methidathion were purchased from Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany). Pesticide stock solutions (concentration 10^{-3} M) were prepared in acetonitrile (Sigma–Aldrich) and stored at 4 °C, pesticide solutions were prepared daily in distilled water by dilution of the stock solution. The oxidation of methidathion was obtained using N-bromosuccinimide provided by Sigma–Aldrich. Sol–gel matrices were prepared using tetramethoxysilane (TMOS), poly(ethylene glycol) 600 (PEG), hydroxyethyl-cellulose (HEC) (Sigma–Aldrich) and hydrochloric acid (HCl) (Carlo Erba, Italy). Graphite (Electrodag 423SS) and silver/silver chloride (Electrodag 418SS) inks were obtained from Acheson (Plymouth, UK). Cobalt phthalocyanine-modified carbon paste was purchased from Gwent Electronic Materials, Ltd. (Gwent, UK). Poly(vinyl)chloride (PVC) sheets (200 mm × 100 mm × 0.5 mm), supplied by SKK (Denzlingen, Germany), were used as support for the screen-printed electrodes. A glycerophthalic paint (Astral, France) was used as insulating layer.

2.2. Apparatus

The determination of AChE activity was carried out with a Hewlett Packard diode array 8451A spectrophotometer. Screen-

printed electrodes were produced using a semi-automatic DEK248 printing machine according to a procedure previously described (Andreasu et al., 2002), but in a three-electrode configuration. The working electrode was a 4 mm-diameter disk, the auxiliary electrode was a 16 mm × 1.5 mm curved track and the Ag/AgCl pseudo-reference electrode was a 5 mm × 1.5 mm straight track. Amperometric measurements were carried out with a 641VA potentiostat (Metrohm, Switzerland), a constant potential of 100 mV was applied between screen-printed working and reference (Ag/AgCl) electrodes. The current was measured using a BD40 (Kipp & Zonen, The Netherlands) flatbed recorder.

2.3. Encapsulation in sol–gel

Among several industrial applications, sol–gel is a well-known technology for building physical matrices dedicated to enzyme immobilization (Brinker & Sheerer, 1990). Sol–gel has been used to entrap a wide variety of biological species, including enzymes and live microorganisms for different applications (Alvarez, Desimone, & Diaz, 2007; Andreasu et al., 2002). Sol–gel immobilization has been shown to improve the stability and catalytic activity of the biomolecules.

Sol–gel process involves hydrolysis of alkoxide precursors under acidic conditions followed by condensation of the hydroxylated units, which leads to the formation of a porous gel. First, a low-molecular weight metal alkoxide precursor molecule such as tetramethoxysilane (TMOS) or tetraethoxysilane (TEOS) is hydrolysed in the presence of water at acidic pH, resulting in the formation of (Si–OH) groups. In a second step, the condensation reaction between silanol moieties at alkaline pH results in the formation of siloxane (Si–O–Si) polymers, creating a matrix in which an enzyme can be successfully entrapped (Sassolas, Blum, & Leca-Bouvier, 2012) (Fig. 3). In some cases, the cracking of the sol–gel polymers can be prevented using doping agents such as poly(ethylene glycol).

In this work the protocol of immobilisation was the following: the sol–gel solution was prepared by mixing 150 µL of the precursor tetramethoxysilane (TMOS) with 413 µL of distilled water, 400 µL of HCl 1 mM, and 37 µL of PEG 600. This mixture was sonicated for 15 min and stored for one night at 4 °C. The enzymatic solution prepared in phosphate buffer (pH 8) was mixed 1:1 (v/v) with HEC (2%). Then, this solution was mixed with the sol–gel in a ratio 2:1 (v/v) (Hayat, Barthelmebs, & Marty, 2012). 2 µL of the obtained solution was quickly deposited on the surface of the working electrode, and allowed to dry for 3 h at room temperature. The amount of enzyme entrapped on each electrode was 3 mIU.

2.4. Determination of acetylcholinesterase activity

Before immobilization, enzymatic activity of AChE was determined using the Ellman's method (Ellman, Courtney, Andres, & Featherstone, 1961), based on the reaction between the enzymatic reaction product thiocholine with DTNB, which leads to the formation of a yellow compound (5-thio-2-nitrobenzoate) that can be spectrophotometrically detected at 412 nm.

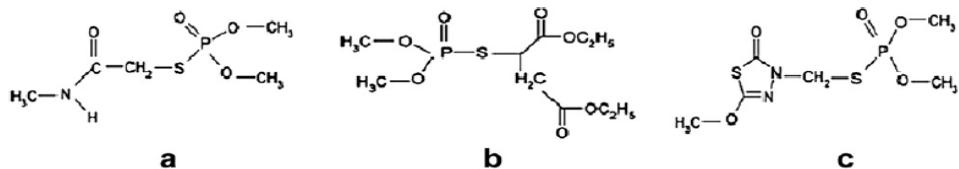


Fig. 1. Structure of organophosphates insecticides used in this study in their oxidized forms: (a) omethoate; (b) malaoxon; (c) methidathion oxide.

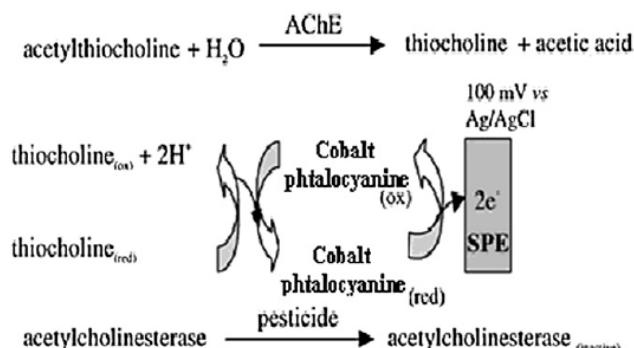


Fig. 2. Principle of the amperometric detection of acetylcholinesterase activity using cobalt phtalocyanine as mediator.

2.5. Determination of the inhibition constant k_i

The mechanism of inhibition of AChE by organophosphate compounds is well-known (Aldridge, 1950). In this work, the inhibition constant k_i was calculated using immobilized enzyme, the calculation procedure was as follows: AChE-based sensors were incubated for 0, 1, 3, 5, 8 and 10 min with different concentrations of pesticides, the enzyme activity was then determined according to the amperometric procedure as described in § 2.6. The residual activity of AChE was calculated by comparing the slope of obtained kinetics before and after inhibition. The graphs obtained by plotting log of residual activity versus incubation time for each inhibitor showed a linear representation. The apparent reaction rate k_{obs} (min^{-1}) were obtained by measuring the slope of this straight line. Plotting $1/k_{\text{obs}}$ versus $1/[I]$ allowed calculating the inhibition constant k_i , which corresponds to the reciprocal value of the obtained slope.

2.6. Amperometric measurements

The screen-printed electrode system was vertically immersed in a thermostated cell (30°C) containing 10 mL phosphate buffer pH 7 under constant magnetic stirring (260 rpm). The applied potential was 100 mV versus Ag/AgCl reference electrode, using cobalt phtalocyanine as mediator. The current intensity was recorded and, after current stabilisation, 1 mM ATCh (final concentration) was added in the cell. The measured signal corresponded to the difference of current intensity between the baseline and the plateau. The cell was washed with distilled water between measurements.

The pesticide detection was made in a three-step procedure as follows: first, the initial response of the electrode to 1 mM ATCh was recorded three times, then the electrode was incubated in a solution containing a known concentration of insecticide, and finally the residual response of the electrode was recorded again. Electrodes were thoroughly washed with distilled water between

each measurement. The percentage of the inhibition was correlated with the insecticide concentration, the inhibition rate was calculated according to the following formula: $I (\%) = [(I_0 - I)/I_0]100$, I and I_0 being respectively the current after the and before inhibition.

2.7. Extraction of pesticides from olive oil

Before assays, the pesticides were extracted using a simple liquid–liquid extraction procedure as follows: 10 mL of a commercially available bio extra virgin olive oil purchased in a local supermarket was spiked with a known concentration of pesticide diluted in hexane. The mixture was heated at 50°C for 30 min, and 500 μL of this olive oil was added to 400 μL of acetonitrile and 100 μL of dichloromethane. The mixture was centrifuged at 13,400 rpm for 90 s and the resulting supernatant was recovered and used as a pesticide mother solution.

3. Results and discussion

3.1. Determination of the inhibition constant k_i

The inhibition constant k_i is proportional to the affinity of the pesticide for the enzyme and its inhibitory power. k_i is therefore a fundamental parameter to compare the inhibitory potency of insecticides and assess the sensitivity of the enzymes studied. Using the immobilized enzyme, inhibition constants of 0.3, 1.7 and 0.004 $\mu\text{M}^{-1}\text{min}^{-1}$ were found respectively for oxidized methidathion, malaoxon and omethoate. These data clearly show that the acetylcholinesterase of electric eel was inhibited most strongly by the malaoxon and the oxidised methidathion but very weakly by omethoate. When compared to the k_i of free AChE (Ben Oujji et al., 2012), the k_i values of immobilized AChE were slightly lowered, probably due to the sol–gel network which acts as a barrier that slows down the diffusion of the inhibitor to the enzyme.

3.2. Oxidation of methidathion

This study focuses on the detection of oxidized forms of organophosphate insecticides, which are less stable but more toxic than the normal forms. The oxidized forms of dimethoate and malathion, respectively called omethoate and malaoxon are commercially available, but in the case of methidathion an oxidation step must be carried out using N-bromosuccinimide (NBS) (Bavcon Kralj, Trebse, & Franko, 2006). The efficiency of this oxidation step was controlled using reverse-phase HPLC, it was shown that 3.10^{-5} M NBS was sufficient for the total oxidation of a 10^{-5} M methidathion solution. The effect of NBS on AChE has been also investigated to ensure that the enzyme was not affected by the oxidizing agent, it was shown that in assays conditions NBS did not inhibit AChE.

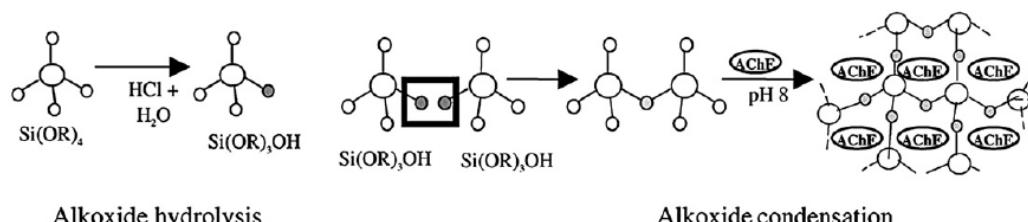


Fig. 3. General principle of sol–gel encapsulation method.

Table 1

Performances of the developed enzymatic sensor for the detection of omethoate, methidathion (oxidized form) and malaoxon. LOD (IC_{10}), IC_{50} and IC_0 are the concentrations of pesticides inducing respectively 10%, 50% and 0% decrease of the signal.

Pesticide	Equation	R^2	IC_0 (M)	IC_{10} (M)	IC_{50} (M)	Dynamic range (M)
Omethoate	$I = 13.859 \ln(C) + 203.83$	0.985	4.0×10^{-7}	4.3×10^{-7}	1.5×10^{-5}	7.5×10^{-5} – 2.5×10^{-6}
Methidathion	$I = 22.796 \ln(C) + 413.91$	0.990	1.3×10^{-8}	2.0×10^{-8}	1.1×10^{-7}	5×10^{-6} – 5×10^{-8}
Malaoxon	$I = 18.366 \ln(C) + 366.74$	0.982	2.1×10^{-9}	3.6×10^{-9}	3.2×10^{-8}	5×10^{-7} – 10^{-8}

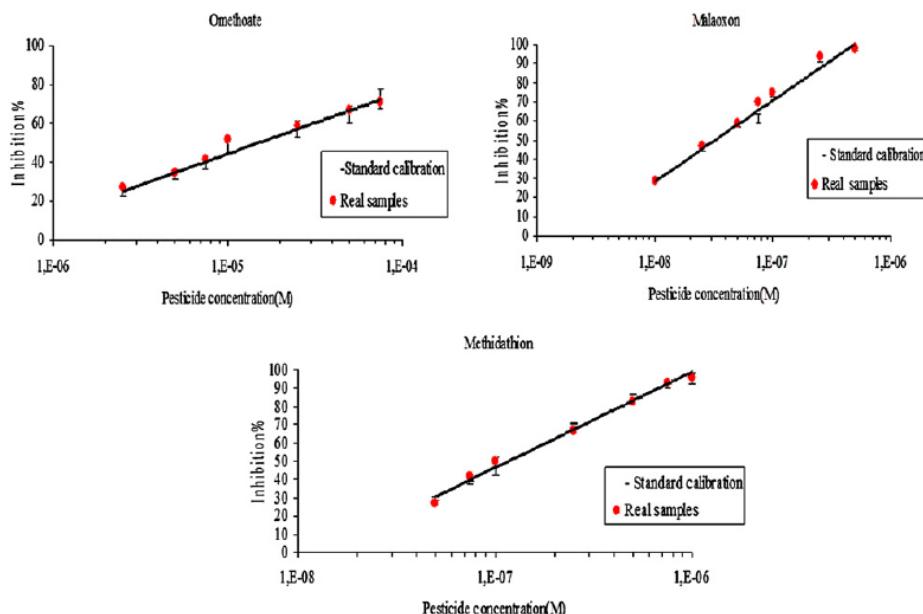


Fig. 4. Detection of omethoate, methidathion and malaoxon in olive oil real samples (●), comparison with the standard curves (straight lines).

3.3. Detection of organophosphates by amperometric method

Operational stability and reproducibility of the developed biosensors was tested to ensure that any decrease in the signal was related to enzyme inactivation by pesticides and not to enzyme leakage. The stability was estimated by repetitive measurements of the response of a single electrode to 1 mM ACh, with intermediate rinses with distilled water. The biosensors showed a good operational stability, as they maintained their initial analytical signal response during 10 successive measurements. The electrodes response for successive substrate injection was $450 \text{ nA} \pm 15 \text{ nA}$ for 10 assays, indicating a good reproducibility of measurements. Inhibition reproducibility experiments were carried out by measuring 5 times the inhibition percentage produced by 10^{-8} M of malaoxon, the obtained results showed a good reproducibility of the developed device with a relative standard deviation (R.S.D.) of 3% ($324 \pm 10 \text{ nA}$). Concerning storage stability, no loss of activity was observed after 1 month storage at -18°C , providing that the electrodes were kept in sealed plastic bags.

Calibration curves were obtained for the three pesticides by incubating the biosensors in insecticide solution of known concentration for 10 min. As expected, the biosensor displayed a very low limit of detection for malaoxon and methidathion, while omethoate was detected with a lower sensitivity (Table 1).

We have described in previous work the immobilisation of electric acetylcholinesterase by covalent coupling on magnetic microbeads (Ben Oujji et al., 2012). The current work demonstrates that biosensors based on the immobilisation of AChE in a sol-gel matrix are more reproducible and stable than those obtained by the immobilisation on magnetic beads, probably due to the absence of the

glutaraldehyde coupling agent which may induce a partial denaturation of the protein. Despite this difference, the sensitivities of the biosensors made according to the two immobilization methods were very similar, as the limits of detection found using the magnetic beads as immobilisation method were in the order of 5.10^{-6} M for omethoate, 10^{-8} M for methidathion and 10^{-9} M for malaoxon.

3.4. Application to real samples

In order to demonstrate their viability, the developed biosensors were applied to the detection of insecticides extracted from spiked olive oil. A blank assay was previously performed in order to verify that any other insecticide was already present in the olive oil. The unspiked olive oil revealed no inhibition effect, whereas the spiked samples exhibit the same inhibition degrees as using the standard solutions (Fig. 4). The recovery percentage of insecticides from the spiked samples was almost 100% for all the pesticides concentration tested, demonstrating the good analytical performance of the developed device for the detection of these pesticides in real samples.

4. Conclusions

A cheap, fast and simple amperometric biosensor was developed based on the immobilisation of a low amount of the acetylcholinesterase by encapsulation in a sol-gel matrix on a screen-printed electrode. The device was applied to the detection of three organophosphorus insecticides mostly used for the treatment of olive trees: malathion, dimethoate and methidathion. The biosensor measurement was performed without a laborious

sample pre-treatment, after a simple liquid–liquid extraction from olive oil. The results showed a good performance of the biosensors with reasonable limits of detection, as well as good reproducibility and stability and a good lifetime when stored at –18 °C. This study highlighted the low sensitivity of the electric eel acetylcholinesterase for omethoate compared to malaoxon and oxidized methidathion, which lead to detection limits as low as 10^{–9} M. The analysis of spiked olive oil samples showed a good correlation with the results obtained using standards solutions, with almost 100% of recovery percentage.

Acknowledgements

Ben Oujji Najwa would like to express gratitude to Averroès programme (EC programme Erasmus Mundus) for granting this work.

References

- Aldridge, W. N. (1950). Some properties of specific cholinesterases with particular reference to the mechanism of inhibition by diethyl p-nitrophenyl thiophosphate (E605) and analogues. *Biochemical Journal*, 46, 451–456.
- Alvarez, G. S., Desimone, M. F., & Diaz, L. E. (2007). Immobilization of bacteria in silica matrices using citric acid in the sol-gel process. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73, 1059–1064.
- Andreescu, S., & Marty, J. L. (2006). Twenty years research in cholinesterase biosensors: from basic research to practical applications. *Biomolecular Engineering*, 23, 1–15.
- Andreescu, S., Barthelmebs, L., & Marty, J.-L. (2002). Immobilisation of AChE on screen-printed electrodes; comparative study between three immobilisation methods; applications to the detection of organophosphorus insecticides. *Analytica Chimica Acta*, 464, 171–180.
- Bavcon Kralj, M., Trebše, P., & Franko, M. (2006). Oxidation as a pre-step in determination of organophosphorus compounds by the AChE-TLS bioassay. *Acta Chimica Slovenica*, 53, 43–51.
- Ben Oujji, N., Bakas, I., Istamboulié, G., Ait-Ichou, I., Ait-Addi, E., Rouillon, R., et al. (2012). Acetylcholinesterase immobilized on magnetic beads for pesticides detection: application to olive oil analysis. *Sensors*, 12, 7893–7904.
- Brinker, C. J., & Sheerer, G. W. (1990). *Sol-gel science. The physics and chemistry of sol-gel processing*. San Diego: Academic Press.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7, 88–95.
- French Department of Agriculture and Agri-Food (AF920805). (2012). Source=MAP/e-phy 22/08/2012.
- Guilbault, G. G., Pravda, M., & Kreuzer, M. (2004). Biosensors-42 years and counting. *Analytical Letters*, 37, 14481–14496.
- Hayat, A., Barthelmebs, L., & Marty, J.-L. (2012). A simple colorimetric enzymatic-assay for okadaic acid detection based on the immobilization of protein phosphatase 2A in sol-gel. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166, 47–56.
- Istamboulié, G., Cortina-Puig, M., Marty, J.-L., & Noguer, T. (2009). The use of artificial neural networks for the selective detection of two organophosphate insecticides: chlorpyrifos and chlorgenvinifos. *Talanta*, 79, 507–511.
- Lentza-Rizos, C., & Avramides, E. J. (1995). Pesticide residues in olive oil. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 141, 111–134.
- Luchetti, F. (2002). Importance and future of olive oil in the world market – an introduction to olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104, 559–563.
- Sassolas, A., Blum, L.-J., & Leca-Bouvier, B.-D. (2012). Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnology Advances*, 30, 489–511.



Molecular imprinting solid phase extraction for selective detection of methidathion in olive oil

Idriss Bakas^{a,b}, Najwa Ben Oujji^{a,b}, Ewa Moczko^c, Georges Istamboulié^a, Sergey Piletsky^c, Elena Piletska^c, Ihya Ait-Ichou^b, Elhabib Ait-Addi^b, Thierry Noguer^{a,*}, Régis Rouillon^a

^a Université de Perpignan Via Domitia, IMAGS EA4218, bâtiment S 52 Av. Paul Alduy, 66860 Perpignan, Cedex, France

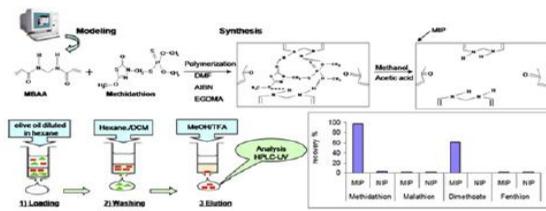
^b Laboratoire AQUAMAR, Équipe Matériaux Photocatalyse et Environnement, Faculté des Sciences, Université Ibn Zohr, B.P. 8106 Cité Dakhla, Agadir, Morocco

^c Cranfield Health, B52, Cranfield University, Cranfield, Bedfordshire, MK43 0AL, UK

HIGHLIGHTS

- Development of a molecular imprinted polymer (MIP), based on molecular modelling for methidathion (organophosphorus insecticide).
- Optimisation of a protocol of extraction based on molecularly imprinted solid phase extraction (MISPE).
- Application of the optimised protocol for the extraction of methidathion from olive oil.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 January 2012
Received in revised form 10 May 2012
Accepted 13 May 2012
Available online 19 May 2012

Keywords:

Computational modelling
Methidathion
MIP
Olive oil

ABSTRACT

A specific adsorbent for extraction of methidathion from olive oil was developed. The design of the molecularly imprinted polymer (MIP) was based on the results of the computational screening of the library of polymerisable functional monomers. MIP was prepared by thermal polymerisation using N,N'-methylene bisacrylamide (MBAA) as a functional monomer and ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA) as a cross-linker. The polymers based on the itaconic acid (IA), methacrylic acid (MAA) and 2-(trifluoromethyl)acryl acid (TFMAA) functional monomers and one control polymer which was made without functional monomers with cross-linker EGDMA were also synthesised and tested. The performance of each polymer was compared using corresponding imprinting factor. As it was predicted by molecular modelling the best results were obtained for the MIP prepared with MBAA. The obtained MIP was optimised in solid-phase extraction coupled with high performance liquid chromatography (MISPE-HPLC-UV) and tested for the rapid screening of methidathion in olive oil. The proposed method allowed the efficient extraction of methidathion for concentrations ranging from 0.1 to 9 mg L⁻¹ ($r^2 = 0.996$). The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) in olive oil were 0.02 mg L⁻¹ and 0.1 mg L⁻¹, respectively. MIPs extraction was much more effective than traditional C18 reverse-phase solid phase extraction.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Over the decades, traditional olive oil industry has played very important role within national economy and culture of Mediterranean countries including Spain, Portugal, Italy or Morocco [1]. Olive oil has been reported as a primary consumption product and essential component of healthy diet for majority of people living in that area due to rich nutritional values, high antioxidant and monounsaturated fatty-acid content [2,3]. Considering its

* Corresponding author. Tel.: +33 0 468662255; fax: +33 0 468662223.

E-mail addresses: e.piletska@cranfield.ac.uk (E. Piletska), ihya.aitichou@gmail.com (I. Ait-Ichou), noguer@univ-perp.fr (T. Noguer), rouillon@univ-perp.fr (R. Rouillon).

beneficial properties and increasing worldwide distribution, there has been an extended demand for efficient cultivation and mass production of olive oil [4]. Beside relevant advances in production, there are some serious problems caused by different insects which attack and damage olive trees. One of them is the common olive oil fruit fly *Bactrocera oleae*, which induces an increase of acidity, affects fruits shelf life and decreases the yield of the olives. In order to protect trees from the infection and avoid significant losses in olive oil production, trees are usually treated with suitable pesticides which act as repellents against flies or other insects. Despite the advantages which agrochemicals offer for the improvement of the olive's yield, they still remain highly toxic and compromise the quality of olive oil. Therefore, regular monitoring and detection of these chemicals are essential for consumer protection and healthy diet [5].

The most extensively used agrochemicals in the cultivation of olives are organophosphorus insecticides [6]. They provide accurate, rapid and cost-effective treatment but become dangerous if applied at the harvest stage. The consumption of the contaminated olives may present a high risk for human health. Additionally, the majority of these pesticides are lipophilic and are able to remain in the oil for extended periods of time [7]. In order to decrease a potential risk of organophosphorus pesticides (OPs) and reduce their appearance in the food products European Union and the Codex Alimentarius Commission of the Food and Agriculture Organisation of the United Nations (FAO) have determined the maximum residue limits which are acceptable and not harmful to humans (MRLs) [4,6]. Since olive oil is a highly complex liquid which consists of triglycerides (98–99%) it is very challenging to find a suitable method which would allow a quick detection and a monitoring of the minimal concentration of pesticides. Among the popular strategies is an isolation or extraction of pesticides fraction from the fatty matrix [8].

In the past years, a most common method which was used for the detection of volatile pesticides has been gas chromatography (GC). GC coupled with mass-spectrometry detector (GC-MS/MS) was particularly suitable for accurate qualitative and quantitative analysis of oil samples [9]. Later the ion-trap mass analyser has been applied for detection of organophosphorus and pyrethroid pesticides [10,11]. More recently, triple quadrupole, flame photometric, nitrogen-phosphorus and electron-capture detectors have been used for determination of multi-class pesticide residues and were very successful due to their high efficiency, selectivity and sensitivity [12–17]. Although all these techniques demonstrate a good performance, they are compromised by complicated sample preparation and high cost of measurements.

Current trends for the control of the pollutants in olive oil are focused on the development of molecularly imprinted solid phase extraction (MISPE) which has already been successfully applied for pre-concentration and trace detection of various analytes in the environmental, clinical or food samples [18–24]. Most of the reported target analytes (e.g. templates) which were used for imprinting have been non-linear molecules, which provided additionally steric recognition [25–35]. In this work a cyclic molecule methidathion, which is commonly found in olive oil, was chosen as a template. To our knowledge, this is the first paper describing application of MIP-based method for the determination of methidathion in olive oil.

2. Experimental

2.1. Reagents

All chemicals including OPs (methidathion, malathion, dimethoate and fenthion), functional monomers (MBAA,

MAA, TFMAA and IA), cross-linker EGDMA, initiator 1,1'-azobisisobutyronitrile (AIBN), solvents (dimethylformamide (DMF), dichloromethane, methanol, acetonitrile, hexane, heptane) and trifluoroacetic acid (TFA) were purchased from Sigma-Aldrich (France). The 3 mL reservoir glass columns with frits were purchased from Chromabond (France).

2.2. Molecular modelling and computational design

The molecular modelling was performed using a workstation from Research Machines running the CentOS 5 GNU/Linux operating system, configured with a 3.2 GHz core 2 duo processor, 4 GB memory and running the SYBYL 7.3 software suite (Tripos Inc., St. Louis, Missouri, USA). A virtual library of 20 functional monomers was designed and screened against of molecular models of OPs (methidathion, malathion, fenthion and dimethoate) using LEAPFROG algorithm [36]. All structures were minimised and Gasteiger-Hückel charges were applied. The binding energies values of electrostatic, hydrophobic, Van der Waals forces, and dipole-dipole interactions were obtained. Monomers which gave the highest binding score were selected for the polymer preparation [37].

2.3. Synthesis of the imprinted polymers

A set of polymers was synthesised based on the results of the computational modelling. Several monomers (MBAA, IA, MAA and TFMAA) which showed the highest binding energy towards the template were selected. The molar ratio of template, functional monomer and cross-linker was 1:4:20 respectively. The polymer was synthesised by mixing 1 mM methidathion (template), 20 mM EGDMA (cross-linker), 40 mg of AIBN (initiator) and 4 mM of suitable monomer in 5 mL of DMF. The mixture was degassed with N₂ for 10 min, sealed in a glass bottle and thermally polymerised in oil bath at 80 °C for 12 h. After synthesis the polymer monolith was grounded and wet sieved with methanol to obtain particles with diameter 45–100 µm. Particles were collected, washed intensively using Soxhlet extraction with methanol/acetic acid solution (90/10, v/v), oven-dried and packed (50 mg) into glass SPE cartridges. Corresponding blank or non-imprinted polymers (NIPs) were prepared using the same protocol in the absence of template.

2.4. Solid phase extraction

MIPs and corresponding NIPs polymer particles (50 mg) were packed into 3 mL glass SPE cartridges between polyethylene frits. Before each experiment polymer was cleaned using 5 mL of methanol and reconditioned with corresponding loading solution.

In order to test the effect of different solvents on the polymer performance, the SPE cartridges were loaded with 1 mL of 1 mg L⁻¹ pesticide dissolved in acetonitrile, dichloromethane, heptane or hexane (flow rate- 1 drop per second). Additional studies were also performed in order to test the polymer's ability for pre-concentration of methidathion and to optimise the washing step. The adsorbed molecules were eluted by applying 1 mL of methanol/2% TFA solution. The eluted solution was evaporated at 50 °C using rotative evaporator and prior to HPLC analysis were reconstituted in 1 mL of acetonitrile/water (50/50, v/v).

In order to evaluate the polymer's binding capacity, SPE cartridges were loaded with 5 mL of different pesticide solutions with concentrations ranging from 0.02 to 2 mg L⁻¹.

The loading of the cartridges with 5 mL- and 10 mL- aliquots were also performed in order to evaluate the possibility to pre-concentrate the diluted concentrations of methidathion using MIP-based cartridge.

Table 1

Screening of a virtual library of functional monomers on their interaction with methidathion.

Functional monomers	Binding energy (kcal mol ⁻¹)
MBAA	-29.36
IA	-26.49
Acrylamide	-25.75
N,N-Diethylamino ethyl methacrylate (DEAEM)	-24.55
Acrylamido-2-methyl-1-propane sulfonic acid (AMPSA)	-18.22
Ethylene glycol methacrylate phosphate (EGMP)	-18.18
Uraconic acid (UA)	-17.74
TFMAA	-15.35
MAA	-14.78
EGDMA	-6.23

Regeneration of the SPE columns was performed by washing the polymer with 1 mL of methanol/0.1 M HCl solution followed by 5 mL of methanol at a flow rate of 2–3 drops per second. The experiments were carried out in triplicates, giving reproducible results with relative standard deviation (RSD) values ranging from 2% to 8%.

2.5. HPLC analysis

The quantification of pesticides was performed using an HPLC L-2000 series LaChrom Elite® system from Merck-Hitachi (VWR, France). Chromatographic separations were carried out with a C18 Supelcosil™ reverse phase column (250 × 4.6 mm, 5 µm) using acetonitrile/water mixture (50/50, v/v) as a mobile phase at flow rate 1 mL min⁻¹. The injection volume was 20 µL. Methidathion, malathion, fenthion and dimethoate were detected respectively at wavelengths 216, 220, 250, and 200 nm, and data acquisition was performed using EZchrom Elite software. Analysed samples (standards and recovered insecticide) were dissolved in the eluent phase (acetonitrile/water, 50/50, v/v). The quantification of organophosphorus pesticides (OPs) was conducted by measuring the peak area and comparing it with the relevant calibration curve. Standard solutions for the calibration curve were prepared by dilution of the stock solution with concentration of 1 g L⁻¹ in acetonitrile in the mobile phase solvent.

3. Results and discussion

3.1. Selection of functional monomer

Computational modelling was performed in order to predict the affinity of different polymers towards the template molecule (methidathion) and to select the best functional monomer which could be further used in the optimisation of MIP. It was expected that functional monomer which demonstrates the highest binding energy towards the template should produce the polymer with the highest affinity [36].

Accordingly the results of computational modelling MBAA was identified as the most promising monomer which could form strong interactions with methidathion (binding energy -29.36 kcal mol⁻¹) (Table 1). Other functional monomers which demonstrated high binding towards methidathion included IA, MAA and TFMAA. Control polymer which was made only with cross-linker EGDMA without any functional monomers was also prepared. Additionally, corresponding NIPs prepared in the absence of template were used in control measurements.

Table 2

Correlation between interaction energy (kcal mol⁻¹) of the molecular complexes between methidathion and functional monomers and imprinting factors (IF) of the MIPs prepared with corresponding monomers.

Number	Functional monomers	Binding energy (kcal mol ⁻¹)	IF
1	MBAA	-29.36	2.02
2	IA	-26.49	1.89
3	TFMAA	-15.35	1.23
4	MAA	-14.78	1.04
5	EGDMA	-6.23	0.73

The performance of each MIP was characterised by its imprinting factor:

$$\text{IF} = \frac{[\text{amount of bound methidathion/mg MIP}]}{[\text{amount of bound methidathion/mg NIP}]}$$

The affinity of MBAA-, IA-, MAA-, TFMAA- and EGDMA-based polymers towards methidathion was analysed by solid phase extraction (SPE). Solutions of methidathion in acetonitrile (2 mg L⁻¹) were loaded onto the polymeric cartridges and eluted. The concentration of pesticide was determined using an HPLC system. The experimental results (corresponding imprinting factors) were compared with values generated by computer modelling (Table 2). These data were in good correlation between experimental results and computer approximations. MBAA-based MIP demonstrated the largest imprinting factor (2.0) which correlated with highest binding energy between MBAA and methidathion molecule. At the same time MIP which was made only with cross-linker without any functional monomer demonstrated the lowest imprinting factor (0.73) which was in agreement with computational modelling (EGDMA, -6.23 kcal mol⁻¹). It was found that MBAA formed multiple point interactions with template which could explain its stronger binding as compared with MAA and IA monomers which only demonstrated a single point interactions, and cross-linker EGDMA which did not show any interactions. MBAA-template molecular complex was defined by hydrogen bonds between two nitrogen atoms of the MBAA and two oxygen atoms of methidathion (Fig. 1S). Thus, the experimental results confirmed the reliability of the computational method used in our studies and clearly indicated that MBAA is able to produce strong interactions with methidathion. This monomer was therefore selected and applied in all further experiments.

3.2. Performance of selected polymer in different solvents

Selected MBAA-based polymer was evaluated for its ability to bind methidathion in solvents with different polarity. Methidathion solutions were prepared in 1 mL of hexane, heptane, dichloromethane and acetonitrile, and loaded onto MIP and NIP-based SPE cartridges containing 50 mg of polymer. Adsorbed molecules were eluted using 1 mL of methanol/2% TFA solution and quantified using HPLC analysis. Results are listed in Table 3.

It was found that MBAA-based MIP showed higher ability to bind methidathion in non polar solvents such as hexane or heptane. Significant loss in its binding activity was observed for polar solvents, especially acetonitrile with only 42% adsorption. The same

Table 3

The effect of different solvents on the adsorption of methidathion.

Solvent	Adsorption (%)	
	MIP	NIP
Hexane	99 ± 2.1	100 ± 3.1
Heptane	100 ± 3.2	100 ± 4.7
Dichloromethane	80 ± 5.2	14 ± 3.8
Acetonitrile	42 ± 1.8	7 ± 3.3

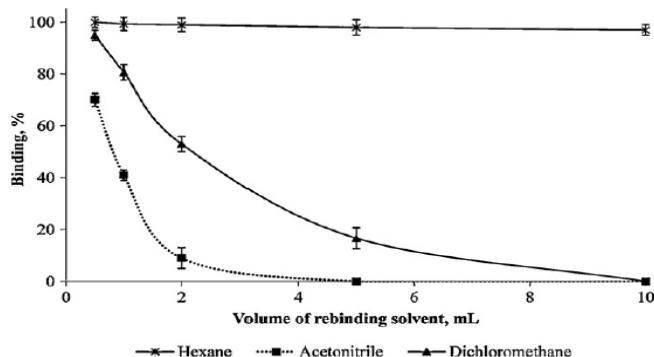


Fig. 1. Effect of the volume of loading solution on the binding of methidathion on the MIP-based polymer.

polymer bound 80% of methidathion in dichloromethane and 42% in acetonitrile. These results were consistent with those reported in literature showing that the strength of binding of analyte to the MIP increased with the decreasing polarity of the rebinding solvent [38]. NIP demonstrated similar to MIP adsorption of methidathion from heptane and hexane solutions, while its binding in dichloromethane and acetonitrile was reduced (respectively 14% and 7%). Therefore dichloromethane was considered as one of the potential solvents for the MIP-based methidathion extraction.

The capability of the MBAA-based MIP to pre-concentrate methidathion was tested by dissolving the same quantity of analyte ($1\text{ }\mu\text{g}$) in the different volumes of hexane and acetonitrile, which were used as models of non-polar and polar solvents. The solutions were loaded onto SPE cartridges containing 50 mg of polymer (Fig. 1). Additional measurements were also performed for dichloromethane.

Fig. 1 shows that in the presence of acetonitrile a significant loss in methidathion binding was observed when volume of the solvent increases from 0.5 to 10 mL. A similar behaviour was observed for dichloromethane. When a small volume (up to 0.5 mL) of methidathion was loaded into SPE cartridges, the percentages of adsorbed methidathion from acetonitrile and dichloromethane increased to 70% and 95%, respectively. Further increase in the volume of dichloromethane and acetonitrile solutions of methidathion resulted in subsequent loss of the MIP's binding activity. When the volume of loading solution increased to 10 mL, no more pesticide binding was observed. This behaviour could be explained by high solubility of methidathion in polar solvents. Hexane was shown to be the only solvent that did not demonstrate any dependence between the percentage of the methidathion adsorption and loading volume, as 100% of methidathion remaining adsorbed by the MIP. These results clearly indicate that hexane was the most suitable solvent for MIP extraction of methidathion from olive oil, therefore it was used in further experiments and optimisation of the SPE protocol.

3.3. Optimisation of washing solution

The washing procedure is a crucial step which could reduce the concentration of interfering compounds in the extracted solution and minimise non-specific interactions between analytes and imprinted polymer. It is important to ensure that the washing process should not affect the specific binding of methidathion to the polymer.

Initially SPE cartridges containing 50 mg of MBAA-based MIP or NIP polymers were conditioned with 5 mL of hexane and loaded with 1 mL of 1 mg L^{-1} methidathion solution in hexane. Different

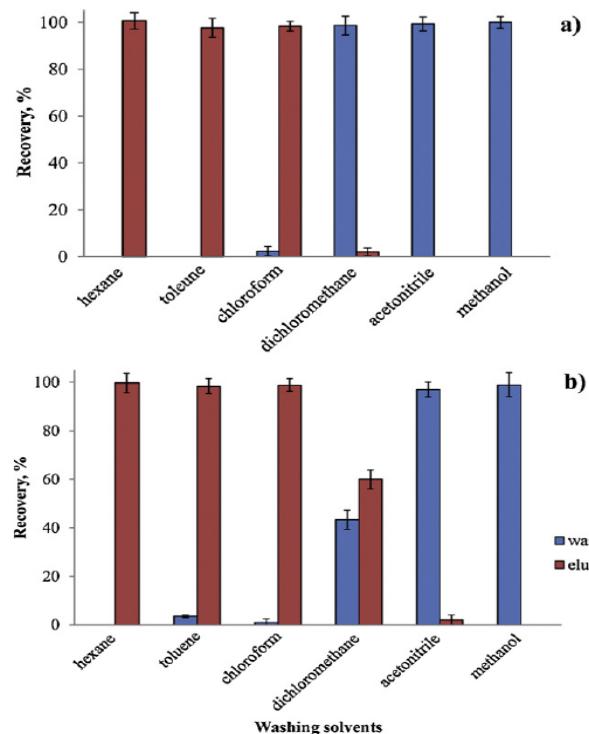


Fig. 2. Recovery of methidathion in the washing (blue) and elution (red) fractions after loading 1 mL of 1 mg L^{-1} pesticide on NIP (a) and MIP cartridges (b). Washing step: 2 mL of the solvents; elution step: 1 mL of methanol/2% TFA. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article).

solvents were tested in order to optimise the washing procedure. Chloroform, toluene, dichloromethane, acetonitrile or methanol (2 mL) were loaded onto the columns, followed by pesticide elution with 1 mL of methanol/2% TFA. Both, washing and elution, fractions were collected and analysed using by reverse-phase chromatography. Fig. 2a shows that after washing of MBAA-based NIP with chloroform, hexane or toluene, all pesticide remained on the polymer, no methidathion being detected in the washing solution. It seems that low polarity organic solvents did not affect the non-specific binding of methidathion by polymer. In contrast, polar solvents like methanol, acetonitrile and dichloromethane demonstrated total removal of the pesticide, suggesting that non-specific binding could be efficiently reduced by using one of these solvents. The same experiment was performed using MBAA-based MIP which showed that acetonitrile and methanol strongly affected specific interactions removing the main amount of pesticide in the washing step (Fig. 2b). Promising results were obtained using dichloromethane, which facilitated the removal of all pesticide bound to NIP (Fig. 2a) but promoted specific interactions between methidathion and MIP (Fig. 2b). About 40% of the pesticide was removed from the cartridge after the washing step and about 60% after elution with methanol/2% TFA. This result indicated that dichloromethane could be very suitable for the MIP washing process.

Further experiments were performed in order to analyse the effect of different dichloromethane ratios in the washing solution (see Fig. 3a and b). The amount of dichloromethane contained in the dichloromethane:hexane washing mixture was varied in the

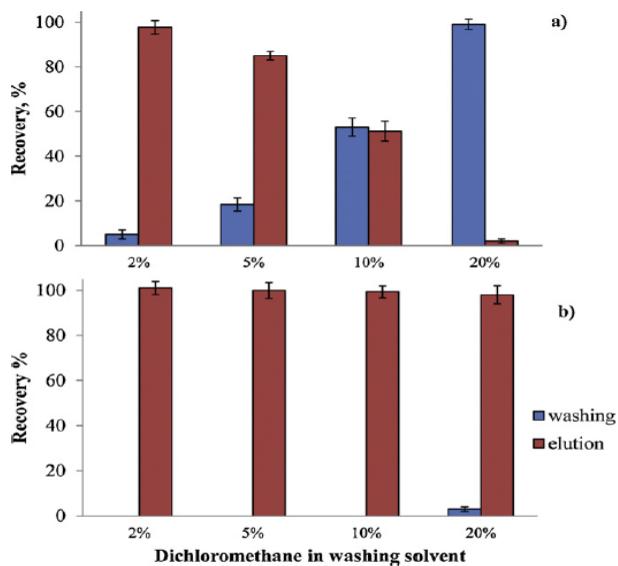


Fig. 3. Recovery of methidathion using NIP (a) and MIP (b) after loading 1 mL of 1 mg L^{-1} pesticide and the polymer washing with different % of dichloromethane in hexane. In blue- washing and in red- elution with 1 mL methanol/2% TFA. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article).

range between 2 and 20%. Fig. 3a clearly illustrates the effect of dichloromethane on non-specific interactions when using NIP. It was found that low percentage of dichloromethane was not sufficient for the reduction of non-specific binding of methidathion to NIP. The increase of the dichloromethane concentration up to 10% and 20% allowed minimising the non-specific binding. This confirmed the results of previous experiments showing that 100% dichloromethane induced a total removal of methidathion from the NIP, whereas the pesticide bound specifically to the MIP was still retained on the column (Fig. 3b).

Fig. 3b shows the effect of washing solution using different dichloromethane ratios on the binding of methidathion on the MIP, followed by elution with 1 mL methanol/2% TFA solution. It appeared that washing the polymer with 80% hexane/20% dichloromethane was sufficient for removal of all methidathion molecules which were not specifically bound to the polymers (NIP and MIP), and that such washing did not affect specific interactions. It was also shown that 1 mL methanol/2% TFA solution can be used for the elution and total recovery of the target analyte. This protocol was therefore applied in all further experiments.

3.4. Evaluation of MIP selectivity and capacity

The evaluation of the selectivity of MBAA-based MIP was carried out using three different OPs: fenthion, malathion and dimethoate (Fig. 4). Pesticide solution (1 mL of 1 mg L^{-1} in hexane) was loaded onto SPE cartridges which were packed with 50 mg of MIP or corresponding NIP. The analysis was performed using HPLC equipped with UV detector. Table 4 shows recovery rates (%) of OPs after SPE washing and elution steps. It was shown that some small quantity of pesticides which were retained by the NIP was completely removed during the washing step. In comparison, MBAA-based MIP retained 98% of methidathion, while dimethoate was only partially retained (62%) and the other two pesticides were not retained at all (malathion and fenthion). Since MBAA-based MIP cannot bind

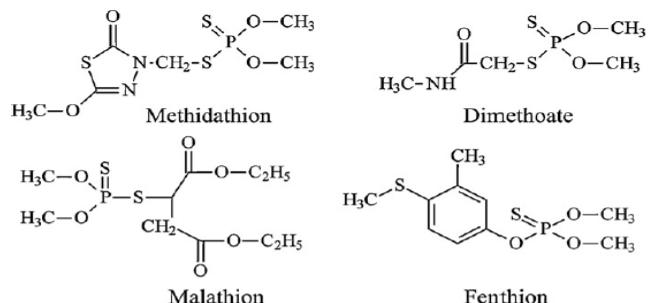


Fig. 4. Chemical structures of OPs insecticides used in oleiculture.

methidathion and fenthion, it suggests about polymer's high selectivity towards methidathion. This could be explained by its unique molecular structure which is quite different from the three others.

The evaluation of MIP capacity was performed by determining the maximum amount of methidathion that can be retained on the polymer. Increasing amounts of methidathion in hexane solution were loaded on SPE cartridges containing 50 mg of MBAA-based MIP. The curve presented in Fig. 5 shows the correlation between the amounts of methidathion extracted (per g of adsorbent) using the MIP and the amounts of pesticide initially applied. A full recovery of methidathion was observed for loadings ranging from 0.1 to 9 μg .

3.5. Extraction of methidathion from olive oil

Commercially available extra virgin olive oil was purchased in a local supermarket and spiked with known concentration of methidathion. The mixture was incubated at 45°C for 30 min while stirring. Then 1 mL of oil which contained 1 μg of methidathion was diluted in 9 mL of hexane and passed through SPE cartridges containing either NIP or imprinted MBAA-based polymer. All interfering components present in olive oil were removed using SPE method which was optimised for methidathion extraction. The cartridges were washed with 2 mL of hexane containing 20% dichloromethane and eluted with 1 mL of methanol/2% TFA solution. Typical HPLC chromatogram of olive oil washing out solution is shown in Fig. 6b. It was found that the retention time for the methidathion was around 10 min. The quantitative recovery from oil samples spiked with 1 mg L^{-1} methidathion was 88.5% for MIP and 5.6% for the NIP. These results show that the designed MIP was efficient for the extraction of methidathion from a complex matrix like olive oil. It must be highlighted that the main quantity of pesticide was extracted in the first millilitre of eluent.

In order to validate the methodology and confirm its potential for the sample clean-up, the MIP was applied to the extraction of olive oil samples spiked with different concentrations of

Table 4
Recovery rates (%) obtained after loading 1 mL of 1 mg L^{-1} pesticide solution onto MIPs and NIPs.

Analytes	NIP		MIP	
	Washing	Elution	Washing	Elution
Methidathion	99 ± 3	nd ^a	nd	98 ± 3
Dimethoate	98 ± 3	nd	42 ± 6	62 ± 6
Malathion	100 ± 3	nd	97 ± 5	nd
Fenthion	99 ± 3	nd	99 ± 3	nd

^a nd – Not detectable.

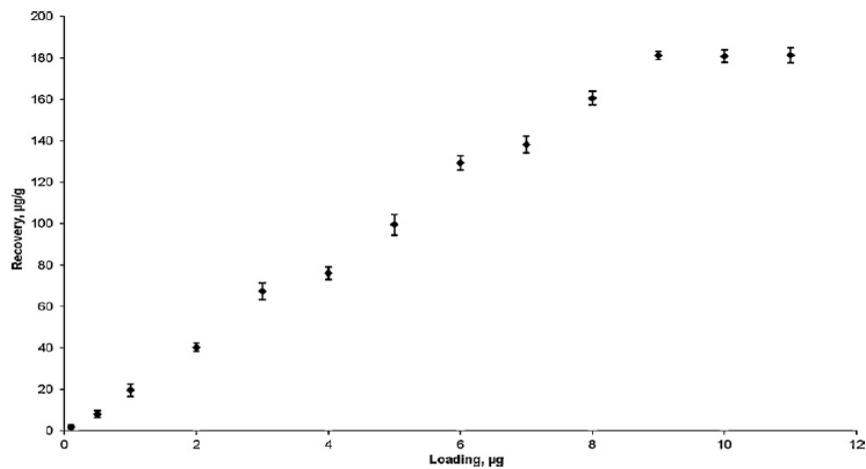


Fig. 5. Capacity curve for 5 mL of hexane spiked with different amounts of methidathion during its loading and recovery.

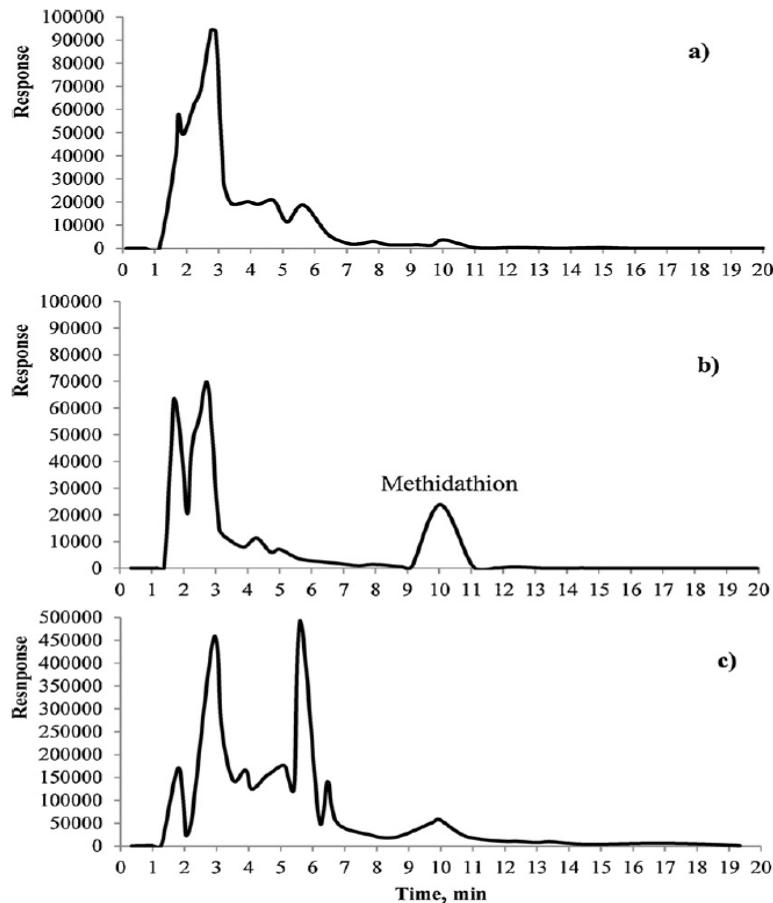


Fig. 6. Chromatograms obtained after extraction of olive oil spiked with 1 mg L^{-1} of methidathion in hexane on NIP cartridge (a), MIP cartridge (b), and on C18-silica SPE cartridge (c). Detection wavelength 216 nm, retention time of methidathion: 10 min.

methidathion (each point repeated for 3 times). The direct correlation between peak areas and concentrations was found over the range of 0.1–9 mg L⁻¹ with a linear regression coefficient (R^2) of 0.996. The limit of detection (LOD) and quantification (LOQ) in olive oil were 0.02 and 0.1 mg L⁻¹, respectively.

In parallel, methidathion-spiked samples were also analysed following liquid/liquid extraction using acetonitrile, and SPE which was performed using C18 column. The performances of MISPE and C18 cartridges were compared in Fig. 6. As can be observed from the chromatograms, a worse baseline was obtained when samples were extracted using C18 column (Fig. 6c). The extraction using MIP-based SPE was shown to be much more selective, providing a cleaner extract containing predominantly methidathion (Fig. 6b). The comparison of two extraction methods clearly demonstrated the advantage of using molecularly imprinted polymers as selective adsorbents for the determination of methidathion. MIPs extraction was much easier to perform as compared with the traditional extraction procedure and showed higher recovery values. Also it was possible to re-use MIP-based SPE columns many times without any deterioration.

4. Conclusion

This study shows the possibility of using molecularly imprinted polymers for the efficient and selective extraction of methidathion from olive oil. Experimental results confirmed that the polymers based on the functional monomer MBAA, which was selected by computational modelling, demonstrated highest affinity for methidathion. A comprehensive study of MIP's performance under various conditions was conducted in order to characterise the polymer and produce the optimal SPE protocol for the binding of methidathion. It is necessary to stress that integration of all important parameters was crucial factor for successful development and optimisation of the protocol for extraction of methidathion from such complex matrix like olive oil. The proposed method proved to be highly accurate, quick and inexpensive. The MISPE method was shown to be more selective to methidathion than the conventional SPE method.

Acknowledgments

Authors acknowledge with gratitude «Volubilis» Hubert Curien programme and its financial support for the project MA/09/215 (Association biocapteurs-matériaux à empreinte moléculaire pour la détection des insecticides utilisés sur l'olivier).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2012.05.013>.

References

- [1] United Nations Conference on Trade and Development (UNCTAD), Based on data from Food and Agriculture Organization of The United Nations (FAO), 2003.
- [2] D. Boskou, Olive Oil: Chemistry and Technology, AOCS Press, Champaign, Illinois, 1996.
- [3] US Food and Drug Administration, News, November 2004 (www.fda.gov/bbs/topics/news/2004/NEW01129.html).
- [4] F. Luchetti, Eur. J. Lipid Sci. Technol. 104 (2002) 559–563.
- [5] C. Lentza-Rizos, Grasas Aceites 47 (1996) 392–396.
- [6] C. Lentza-Rizos, E.J. Avramides, Rev. Environ. Contam. Toxicol. 141 (1995) 111–134.
- [7] P. Cabras, A. Angioni, V.L. Garau, M. Melis, F.M. Pirisi, M. Karim, E.V. Minewlli, J. Agric. Food Chem. 45 (1997) 2244.
- [8] M. López-Mesas, M. Crespi, Grasas Aceites 51 (2000) 183–189.
- [9] J.F. García Reyes, C. Ferrer, M.J. Gómez Ramos, A. Molina Diaz, A.R. Fernández Alba, Trends Anal. Chem. 26 (2007) 239–251.
- [10] M. Guardia Rubio, M.L. Fernández De Córdoba, M.J. Ayora Cañada, A. Ruiz Medina, J. Chromatogr. A 1108 (2006) 231–239.
- [11] F.A. Esteve Turrillas, A. Pastor, M. de la Guardia, Anal. Chim. Acta 553 (2005) 50–57.
- [12] A. Garrido Frenich, J.L. Fernández Moreno, J.L. Martínez Vidal, F.J. Arrebo Laíbanas, J. Agric. Food Chem. 55 (2007) 8346–8352.
- [13] G. Dugo, G. Di Bella, L. La Torre, M. Saitta, Food Control 16 (2005) 435–438.
- [14] LL. Zhiqiang Zhou, C. Pan, C. Qian, S. Jiang, F. Liu, J. Chromatogr. B 66 (2007) 625–629.
- [15] E.G. Amvrazi, T.A. Albanis, J. Agric. Food Chem. 54 (2006) 9642–9651.
- [16] C. Yagüe, S. Bayarri, P. Conchello, R. Lázaro, C. Pérez-Arquillué, A. Herrera, A. Ariño, J. Agric. Food Chem. 53 (2005) 5105–5119.
- [17] E.M. Diaz Plaza, J.M. Cortés, A. Vázquez, J. Villén, J. Chromatogr. A 1174 (2007) 145–150.
- [18] E. Caro, N. Masque, R.M. Marce, F. Borrull, P.A.G. Cormack, D.C. Sherrington, J. Chromatogr. A 963 (2002) 169–178.
- [19] K. Hosoya, K. Yoshizako, H. Sasaki, K. Kimata, N. Tanaka, J. Chromatogr. A 828 (1998) 91–94.
- [20] E.P.C. Lai, S.G. Wu, Anal. Chim. Acta 481 (2003) 165–174.
- [21] P.D. Martin, G.R. Jones, F. Stringer, I.D. Wilson, J. Pharm. Biomed. Anal. 35 (2004) 1231–1239.
- [22] S.G. Hu, L. Li, X.W. He, Anal. Chim. Acta 537 (2005) 215–222.
- [23] F. Puoci, C. Garreffa, F. Iemma, R. Muzzalupo, U.G. Spizzirri, Food Chem. 93 (2005) 349–353.
- [24] M.L. Zhang, J.P. Xie, Q. Zhou, G.Q. Chen, Z. Liu, J. Chromatogr. A 984 (2003) 173–183.
- [25] B. Sellergren, Trends Anal. Chem. 18 (1999) 164–174.
- [26] K. Karim, F. Breton, R. Rouillon, E.V. Piletska, A. Guerreiro, I. Chianella, S.A. Piletsky, Adv. Drug Delivery Rev. 57 (2005) 1795–1808.
- [27] I.A. Nicholls, K. Adbo, H.S. Andersson, P.O. Andersson, J. Ankarkroo, J. Hedin Dahlström, P. Jokela, J.G. Karlsson, L. Olofsson, J.P. Rosengren, S. Shoravi, J. Svensson, S. Wikman, Anal. Chim. Acta 435 (2001) 9–18.
- [28] M.J. Whitcombe, L. Martin, E.N. Vulson, J. Chromatogr. A 47 (1998) 457–464.
- [29] J. Svensson, J.G. Karlsson, I.A. Nicholls, J. Chromatogr. A 1024 (2004) 39–44.
- [30] T. Sagawa, K. Togo, C. Miyahara, H. Ihara, K. Ohkubo, Anal. Chim. Acta 504 (2004) 37–41.
- [31] J. O'Mahony, A. Molinelli, K. Nolan, M.R. Smyth, B. Mizaikoff, Biosens. Bioelectron. 20 (2005) 1884–1893.
- [32] B.J. Brune, J.A. Koehler, P.J. Smith, G.F. Payne, Langmuir 15 (1999) 3987–3992.
- [33] S. Striegler, E. Tewes, Eur. J. Inorg. Chem. 2 (2002) 487–495.
- [34] T. Takeuchi, D. Fukuma, J. Matsui, Anal. Chem. 71 (1999) 285–290.
- [35] F. Lanza, B. Sellergren, Anal. Chem. 71 (1999) 2092–2096.
- [36] S.A. Piletsky, K. Karim, E.V. Piletska, C.J. Day, K.W. Freebairn, C.H. Legge, A.P.F. Turner, Analyst 126 (2001) 1826–1830.
- [37] F. Breton, R. Rouillon, E.V. Piletska, K. Karim, A. Guerreiro, I. Chianella, S.A. Piletsky, Biosens. Bioelectron. 22 (2007) 1948–1954.
- [38] B. Sellergren, L.I. Andersson, Methods 22 (2000) 92–106.



Computational and experimental investigation of molecularly imprinted polymers for selective extraction of dimethoate and its metabolite omethoate from olive oil

Idriss Bakas^{a,b}, Najwa Ben Oujji^{a,b}, Ewa Moczko^c, Georges Istamboulie^a, Sergey Piletsky^c, Elena Piletska^c, Elhabib Ait-Addi^b, Ihya Ait-Ichou^b, Thierry Noguer^{a,*}, Régis Rouillon^a

^a Université de Perpignan Via Domitia, IMAGES EA4218, 52 Av. Paul Alduy, F-66860 Perpignan cedex, France

^b Laboratoire AQUAMAR, Equipe Matériaux Photocatalyse et Environnement, Faculté des Sciences, Université Ibn Zohr, B.P. 8106 Cité Dakhla, Agadir, Morocco

^c Cranfield Health, B52, Cranfield University, Bedfordshire MK43 0AL, UK

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 July 2012

Received in revised form

15 November 2012

Accepted 25 November 2012

Available online 16 December 2012

Keywords:

Computational modelling
Molecularly imprinted polymer
Dimethoate
Olive oil

ABSTRACT

This work presents the development of molecularly imprinted polymers (MIPs) for the selective extraction of dimethoate from olive oil. Computational simulations allowed selecting itaconic acid as the monomer showing the highest affinity towards dimethoate. Experimental validation confirmed modelling predictions and showed that the polymer based on IA as functional monomer and omethoate as template molecule displays the highest selectivity for the structurally similar pesticides dimethoate, omethoate and monocrotophos. Molecularly imprinted solid phase extraction (MISPE) method was developed and applied to the clean-up of olive oil extracts. It was found that the most suitable solvents for loading, washing and elution step were respectively hexane, hexane-dichloromethane (85:15%) and methanol. The developed MIPSE was successfully applied to extraction of dimethoate from olive oil, with recovery rates up to 94%. The limits of detection and quantification of the described method were respectively 0.012 and 0.05 $\mu\text{g g}^{-1}$.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Olive cultivation is widespread throughout the Mediterranean region and is important for the economy, tradition and environment [1]. To protect olives from fungi and pests it is often required to use different pesticides, which improve their growth, increase yield and prolong the storage. One of the most common and dangerous pest for olive trees is the fruit fly *Bactrocera oleae*, which causes serious losses in olive oil production [2]. Every year a lot of effort is put for better protection and treatment against insects and to control the fly population. Unfortunately, majority of those actions involve the application of various pesticides which are dangerous for environment and human health. Organophosphorus insecticides are pesticides used in large quantities in olive plantations of Mediterranean countries. Their residues can survive to the harvest stage, so that trace amounts of these pesticides are likely to be found in olive oil [3–7]. Consequently, The European Union, the Codex Alimentarius Commission of the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) and the World Health Organization

(WHO) have established maximum residue limits (MRLs) for pesticide residues in olives and olive oil. For this reason, simplest, reliable methodologies for rapid detection of these compounds in complex olive oil samples are essential. This drives the need for different strategies to isolate or to extract the pesticide fraction from the whole fatty matrix [8].

Until now, the most widely used techniques for determining pesticide residues in olive oil are gas chromatography (GC) methods that require the extraction of the pesticides from samples. However, analytical problems associated with fatty substrates are well known [9,10]. Olive oil is particularly difficult to analyze because of the high amount of lipids that co-extract with the analyte, affecting GC determination [11].

Consequently, reliable and efficient pre-concentration and clean-up method are needed before performing both GC and HPLC analyses. Solid-phase extraction (SPE) is widely used to pre-concentrate and clean-up the organophosphorus pesticides from complex environmental and biological matrices [12–17]. The most used sample-treatment procedures include liquid–liquid extraction (LLE) based on partitioning between hexane or light petroleum and acetonitrile, followed by clean-up using commercial SPE cartridges [18,19]. These techniques require large amounts of sample and organic solvents and are time consuming. On the other hand, the commonly used sorbents (C18, Florisil, etc.) retain analytes using non-selective hydrophobic or polar interactions which lead

* Corresponding author. Tel.: +33 0468662255; fax: +33 0468662223.

E-mail addresses: e.piletska@cranfield.ac.uk (E. Piletska), ihya.aitichou@gmail.com (I. Ait-Ichou), noguer@univ-perp.fr (T. Noguer), rouillon@univ-perp.fr (R. Rouillon).

to a partial co-extraction of interfering substances. Therefore, the development of new functionalized polymeric selective sorbents may be a promising way in order to facilitate the trace enrichment of analytes and enhance the selectivity of the extraction.

Molecularly imprinted polymers (MIPs) appear as very promising polymeric sorbents for selective SPE of target compounds from complex matrices. In the recent years, they have been utilized in the selective extraction of many compounds, and several reviews have been published demonstrating their advantages for developing selective sample pre-treatment methods [20–23].

Dimethoate (2-dimethoxyphosphinothioylthio-N-methylacetamide (IUPAC)) was selected as the target analyte in the present work as it is the most used organophosphorus insecticide for the treatment of olive trees in Morocco. The action of dimethoate is based on the irreversible inhibition of the enzyme acetylcholinesterase. Omethoate is the main oxidized metabolite of dimethoate, it displays a higher neurotoxicity than its mother compound.

The present paper describes the synthesis and the evaluation of MIPs for the selective extraction of dimethoate and its oxidized form omethoate. To the best of our knowledge, molecular imprinting has not been used before in order to pre-concentrate and purify these pesticides from such a complex matrix as olive oil. The obtained MIP was applied as a SPE sorbent to extract dimethoate and omethoate from olive oil, and the obtained results were compared with those achieved after conventional clean-up using reverse phase SPE.

2. Experimental

2.1. Chemicals

Methacrylic acid (MAA), 2-(trifluoromethyl)acryl acid (TFMAA), itaconic acid (IA), ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA), 1,1'-azobis (isobutyronitrile) (AIBN), trifluoroacetic acid (TFA), acetic acid, dimethylformamide (DMF), hexane, toluene, chloroform, dichloromethane, methanol and acetonitrile were purchased from Sigma-Aldrich (France). The organophosphorus pesticides dimethoate, omethoate, monocrotophos, methidathion, malathion and fenthion were also from Sigma-Aldrich. The 3-mL reservoir glass columns with frits were purchased from Chromabond (France) and the glass microplate containing a library of non-imprinted polymers (NIPs) was prepared by Cranfield University (UK).

2.2. Molecular modelling

The workstation used to simulate monomers/template interactions was Research Machines running the CentOS 5 GNU/Linux operating system. It was configured with a 3.2 GHz core 2 duo processor, 4 GB memory. This system was used to run the SYBYL 7.3 software suite (Tripos Inc., St. Louis, MO, USA). The structure of dimethoate was minimized and screened against 20 functional monomers using LEAPFROG algorithm as described earlier [24]. Based on the binding energies values of electrostatic, hydrophobic, Van der Waals forces, and dipole–dipole interactions, the monomers with the highest binding energies were selected for the polymer preparation [25].

2.3. Preparation of imprinted polymers

The template molecule, the corresponding amounts of functional monomer and the cross-linker EGDMA were dissolved in DMF in the molar ratio 1:4:20 in a round-bottom flask, the initiator AIBN was also added (Table 1). The flask was sealed after the mixture solution was degassed under nitrogen for 10 min, and then it

was incubated in an oil bath at +80 °C for 16 h. The polymer monoliths were crushed, ground and sieved through a sieve with pores of diameter 45–100 µm. The particles with appropriate size were collected. The polymers were then washed with methanol/acetic acid (90:10, v/v) in a Soxhlet apparatus until no more template could be detected by HPLC-UV analysis. Washing with methanol was then used to remove the residual acetic acid, and the polymers were dried in an oven at +70 °C. In parallel, control blank polymers were prepared in the absence of template and treated in the same manner.

2.4. Optimization of the SPE procedure

2.4.1. Selection of the loading solvent

Aliquots between 0.5 and 3 mL of each solvent (hexane, dichloromethane, acetonitrile and methanol), spiked with 1 µg of pesticide were filtered through the cartridges which were packed with 50 mg of MIP or blank polymer. Before filtration, cartridges were cleaned and reconditioned with suitable solution, depending on the solvent used for the loading. The target molecules were eluted from the cartridge using 1 mL of methanol. This fraction was then evaporated to dryness, reconstituted in 1 mL of a water/acetonitrile (50:50, v/v) and analyzed by HPLC. The HPLC system was a L-2000 series LaChrom Elite® system from Merck-Hitachi driven by EZchrom Elite software (VWR, France). The organophosphorus insecticides were monitored at 220 nm. The reverse-phase column was a C18 Supelcosil™ (25 cm × 4.6 mm, 5 µm). The mobile phase was a mixture of acetonitrile and water (50:50, v/v) running in isocratic mode. The injection volume was 20 µL and the flow rate was set at 1 mL min⁻¹.

2.4.2. Evaluation of the washing solution

A molecularly imprinted solid phase extraction (MISPE) cartridge was used to evaluate different washing and elution solutions. The cartridge was first washed with methanol and conditioned with 5 mL hexane, then 1 mL of hexane containing dimethoate (1 mg L⁻¹) was loaded at a flow rate of 0.2 mL min⁻¹. The cartridge was washed with different organic solvents and then dimethoate was eluted using 1 mL-aliquot of methanol at a flow rate of 0.5 mL min⁻¹. The eluates were collected and dried with a rotary evaporator. The residue was dissolved into 1 mL of mobile phase and analyzed by HPLC. The amount of dimethoate recovered after loading, washing, and elution steps was determined.

2.5. Olive oil sample preparation and solid-phase extraction

2.5.1. Clean-up of olive oil using MIP and blank polymer

Commercially available extra virgin olive oil was purchased from a local supermarket and spiked with various concentrations of dimethoate in hexane. The mixture was incubated at +45 °C for 30 min, stirred and then 1 mL of spiked oil was diluted in 9 mL of hexane, stirred for 5 min, and then filtered through SPE cartridges containing either blank or imprinted IA-based polymer. All interfering components present in olive oil were cleaned-up using the optimized washing solution, and the elution was performed with 1 mL of methanol. The fraction was collected and evaporated to dryness. The residue was dissolved in 1 mL of a water/acetonitrile (50:50) mixture, and analyzed with reverse-phase analytical HPLC.

2.5.2. Liquid–liquid extraction of pesticides and clean-up using C18 SPE

A C18 SPE cartridge (Sep-Paq® Plus, Waters) was used for the clean-up of olive oil in order to compare its selectivity with the developed MISPE method. A preliminary liquid–liquid extraction was performed before SPE clean-up. 1 mL of olive oil contained 1 µg of dimethoate was transferred into a separating funnel, the beaker

Table 1

Composition of the prepared MIPs. Blank polymers were made using the same protocol as corresponding MIP but without template.

Polymer	Template (mg)	Functional monomer (mg)	Cross-linker (g)	Solvent DMF (g)	Initiator (mg)
MIP1 (MAA-dimethoate)	66.4	100	1.2	1.5	10
MIP2 (MAA-omethoate)	61.8	100	1.2	1.5	10
MIP3 (MAA-monocrotophos)	64.7	100	1.2	1.5	10
MIP4 (IA-dimethoate)	44	100	0.72	1.5	10
MIP5 (IA-omethoate)	40.9	100	0.72	1.5	10
MIP6 (IA-monocrotophos)	42.8	100	0.72	1.5	10
MIP7 (TFMAA-dimethoate)	40.9	100	0.71	1.5	10
MIP8 (TFMAA-omethoate)	38	100	0.71	1.5	10
MIP9 (TFMAA-monocrotophos)	39.8	100	0.71	1.5	10

was rinsed at least twice with 25 mL of acetonitrile. The separating funnel was shaken vigorously for at least 2 min and placed horizontally in a freezer at a temperature lower than 18 °C, during at least 3 h for allowing the phase separation. After complete separation, the supernatant acetonitrile phase was recovered with caution in a 100 mL flask. Finally, the acetonitrile solution was evaporated to approximately 3 mL using a rotary evaporator.

The purification of the solution on the C18 SPE cartridge was made according to the following steps. The cartridge was firstly washed with 12 mL of methanol and conditioned with 12 mL of acetonitrile. 3 mL of extraction solution was then filtered, and the retained molecules were eluted using 1.5 mL methanol. The eluted solution was evaporated, reconstituted in 1 mL of water/acetonitrile (50:50) mixture and analyzed by HPLC.

2.6. Experimental validation

This experimental approach consisted in measuring absorbance of pesticides solutions in organic solvent (heptane), which were dispensed into glass microplate wells containing 20 blank polymers. The binding affinity of polymers with organophosphorus pesticides was validated based on the absorption of the solution of pesticide before and after 1-h incubation in the microtiter plate. Absorbance measurements have been performed using a UV-Vis spectrophotometer (Shimadzu, Tokyo, Japan) at 220 nm.

3. Results and discussion

3.1. Selection and experimental validation of functional monomers

Computational modelling was used to identify the monomers showing the highest affinity to dimethoate. Following the results of modelling (Table 2), it appeared that the monomers EGMP, IA, MAA formed strong interactions with dimethoate and were candidates for the production of MIPs specific to this target molecule.

The results of molecular modelling were then compared with the binding of dimethoate by corresponding blank polymers in glass microtitration plates. Results were analyzed by measuring

Table 2

Comparison of the binding energies obtained using molecular modelling and the binding of 100 µg mL⁻¹ dimethoate by a library of corresponding blank polymers prepared in glass microplates.

Number	Functional monomer	Binding energy (kcal mol ⁻¹)	Binding (%)
1	EGMP	-41.25	90
2	IA	-39.89	91.6
3	MAA	-38.94	89.7
4	AMPSA	-37.68	89.0
5	TFMAA	-36.56	89.7
6	MBAA	-29.89	86.1
7	Acrylamide	-25.06	83.7

the absorbance of pesticides solutions before and after incubation with the different polymers. It was found that the binding of dimethoate varied significantly, the best candidates for imprinting included the following computationally selected functional monomers: IA, EGMP, MAA, TFMAA and AMPSA (Table 2). The binding of dimethoate by blank polymers with the calculated binding energy of the corresponding functional monomers and dimethoate, a good correlation was observed between experimental results and theoretical calculations (Table 2). As shown in Table 2, the polymers produced using monomers with the highest binding energy towards dimethoate (EGMP and IA) demonstrated the highest adsorption capacity ($\approx 91\%$), whereas the polymer prepared with acrylamide, the monomer with the lowest binding energy, showed the lowest adsorption. These experimental results confirmed the reliability of the computational method used in our studies. Therefore, IA, EGMP, MAA and TFMAA could be selected as suitable functional monomers for the preparation of MIPs.

3.2. Preparation of MIPs using the selected monomers

It is well known that strong interactions between a monomer and a template determine the good binding and selectivity of the MIPs [24]. According to the results of molecular modelling and adsorption, three monomers including IA, MAA and TFMAA were selected as functional monomers for MIPs preparation, based on their high affinity towards template and their commercial availability. Two functional and structural analogues of dimethoate (omethoate and monocrotophos) (Fig. 1) were also used as templates for the preparation of the polymers. In these assays, acetonitrile was used as loading solvent to avoid any non-specific binding during MISPE. Elution of dimethoate was performed using 1 mL of methanol.

The results of imprinting factors of the selected polymers to dimethoate are compared in Table 3.

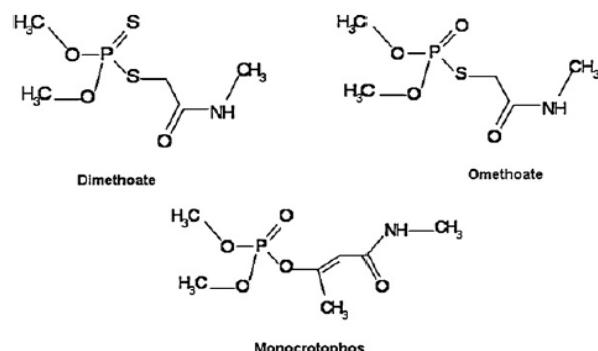


Fig. 1. Chemical structures of dimethoate, omethoate and monocrotophos.

Table 3

Retention of dimethoate by different MIPs and corresponding blank polymers.

Polymers (functional monomer-template)	Amount of bound dimethoate (μg)		IF = MIP/blank
	MIP	Corresponding blank polymer	
MIP1 (MAA-dimethoate)	0.74	0.13	5.6
MIP2 (MAA-omethoate)	0.80	0.14	5.7
MIP3 (MAA-monocrotophos)	0.61	0.2	3.1
MIP4 (IA-dimethoate)	0.75	0.18	4.2
MIP5 (IA-omethoate)	0.88	0.11	8.0
MIP6 (IA-monocrotophos)	0.66	0.12	3.2
MIP7 (TFMAA-dimethoate)	0.55	0.13	4.2
MIP8 (TFMAA-omethoate)	0.66	0.19	3.5
MIP9 (TFMAA-monocrotophos)	0.63	0.12	5.3

Table 4

Dimethoate recovery rate as a function of the nature and the volume of loading solvent, using either MIP or corresponding blank polymer.

Loading solvent	Volume of loading solvent					
	0.5 mL		1 mL		3 mL	
	MIP	Blank	MIP	Blank	MIP	Blank
Acetonitrile	85 ± 3.5	10 ± 2.3	26 ± 4.2	nd	nd	nd
Methanol	63 ± 2.7	12 ± 2.9	nd	nd	nd	nd
Dichloromethane	95 ± 4.2	48 ± 3.3	52 ± 3.7	22 ± 2.5	28 ± 4.3	nd
Hexane	99 ± 4.6	97 ± 4.01	100 ± 3.9	98 ± 4.3	98 ± 5.1	97 ± 3.6

nd, not detectable.

It was found that MIP2 polymer based on MAA and omethoate template binds dimethoate better than other MAA-based polymers (MIP1 and MIP3) (Table 3). A strong binding was also observed in the case of IA-based polymer suing the same omethoate template (MIP5). In the case of TFMAA-based imprinted polymer, the strongest binding to dimethoate was obtained for the polymer based on monocrotophos template (MIP 9). These results show that the MIP based on IA as functional monomer and omethoate as template (MIP 5) gave the highest value of imprinted factor (IF = 8.0), while the MIP using MAA-monocrotophos led to the lowest IF(3.1). The high affinity of IA-omethoate MIP towards dimethoate can be easily explained by the very similar structure of these pesticides, omethoate resulting from oxidation of dimethoate (Fig. 1). For these reasons, IA-omethoate MIP (MIP 5) was selected for further tests.

3.3. Optimization of the protocol for solid-phase extraction

3.3.1. Selection of loading solvent

The binding of dimethoate to polymers was tested using loading solvents having different polarity. The results presented in Table 4 show that the binding of dimethoate to MIP was relatively low using acetonitrile and methanol as loading solvents (less than 90%). The same observation was made using non-imprinted blank polymers. That might be due to the high solubility of dimethoate in polar solvents. The best binding was achieved using hexane or dichloromethane in small volume (0.5 mL), but in this latter case a significant loss in binding was observed using higher loading volumes (Table 4). The highest binding was obtained in hexane, as no difference in polymer performance was observed when changing the volume of loading solution. This result suggested that the strongest interactions between MIP and template were obtained in apolar solvents. Hexane was thus chosen as loading solvent in further experiments.

3.3.2. Selection of washing and elution solvents

Washing solvent was optimized to reduce the non-specific binding on polymers and for selective extraction of target analytes.

Results are presented in Fig. 2a for blank polymer and Fig. 2b for MIP. In both cases, a full recovery of dimethoate was achieved using methanol or acetonitrile as washing solvent. This result suggests that these polar solvents allow eliminating both specific and non-specific interactions between dimethoate and the polymers.

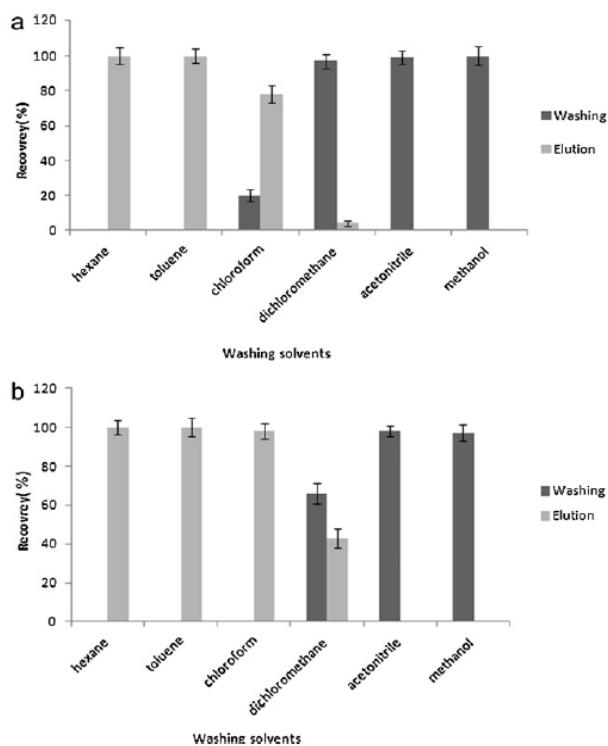


Fig. 2. Recovery of dimethoate in washing (dark grey) and elution (light grey) fractions after loading 1 mL of 1 mg L^{-1} dimethoate on NIP (a) and MIP cartridges (b). Washing step: 2 mL of assayed solvents; elution step: 1 mL of methanol.

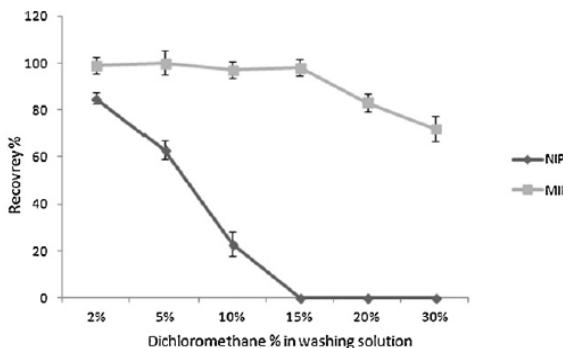


Fig. 3. Recovery of dimethoate using NIP (dark grey) and MIP (light grey) after washing the polymers with 5 mL of hexane containing different ratios of dichloromethane, followed by elution with 1 mL of methanol.

Such behaviour showed that, as expected, these solvents were not suitable for washing step but were particularly adapted for elution. Due to its aprotic properties, methanol was preferred as elution solvent in further experiments. Apolar solvents (hexane, toluene and chloroform) did not affect the binding on the MIP, but they were not able to suppress non-specific interactions between template and blank polymer. Promising results were obtained using dichloromethane, which is less polar and allowed removing all the pesticide from blank polymers (Fig. 2a). Unfortunately it appeared that 65% of dimethoate was also removed from the imprinted polymer using this solvent, the remaining 43% being eluted by methanol (Fig. 2b). Despite this, dichloromethane was considered as a promising washing solvent as it allowed the total removal of molecules non-specifically bound to the polymers. Since hexane had no effect on specific interactions, a mixture of hexane and dichloromethane was thus used to optimize the washing process and facilitate specific interactions between dimethoate and MIP. Experiments were carried out using different ratios of dichloromethane in hexane as washing solution. It was shown that increasing the ratio of dichloromethane in hexane (up to 15%) did not affect elution of dimethoate from MIP but gradually increased its elution from blank polymer (Fig. 3). Further increase of dichloromethane concentration (up to 30%) induced a decrease of dimethoate binding to the MIP and allowed removing all dimethoate from blank polymer. Based on these results, the washing solution used in further experiments was 5 mL of a mixture of hexane and dichloromethane (85:15%).

3.4. Polymer selectivity

In order to evaluate the selectivity of IA-based omethoate MIP (MIP5), several organophosphorus insecticides such as omethoate, monocrotophos, malathion, fenthion, and methidathion were tested. 5 mL of hexane containing 1 mg L⁻¹ of each pesticide were loaded onto SPE cartridges containing either MIP or the corresponding blank polymer. The results listed in Table 5 show the recovery rates (%) obtained after washing and elution process. All the tested pesticides were almost completely removed from the blank polymer during the washing step. Using MIP, no loss was observed for dimethoate, omethoate and monocrotophos, while malathion and fenthion were totally washed out. The elution step confirmed the high affinity of MIP for dimethoate, omethoate and to a lesser extent monocrotophos, with recovery rates up to 98%, 99%, and 85%, respectively. This high cross-selectivity of MIP is not surprising, according to the very similar chemical structure of these three insecticides. In conclusion, MIP revealed a high molecular selectivity and group-selectivity for organophosphates having

Table 5

Recovery rates (%) of various pesticides (1 mg L⁻¹) after washing and elution steps, using either MIP or corresponding blank polymer. Tests were performed in triplicate, RSD < 6%.

Pesticide	MIP		NIP	
	Washing	Elution	Washing	Elution
Dimethoate	nd	98 ± 4.8	94 ± 4.1	nd
Omethoate	nd	99 ± 4.5	98 ± 3.6	nd
Monocrotophos	nd	85 ± 3.7	93 ± 4.8	nd
Methidathion	44 ± 5.7	64 ± 6.3	97 ± 3.1	nd
Malathion	98 ± 2.4	nd	98 ± 5.3	nd
Fenthion	96 ± 3.3	nd	96 ± 2.9	nd

nd, not detectable.

a similar structure as the template molecule, clearly suggesting that the shape of template molecule plays an important role in its selective binding to the polymer. Additional experiments showed that the designed MIP cartridge allowed the selective extraction of dimethoate at concentrations up to 40 µg g⁻¹.

3.5. Analysis of olive oil

The reliability of MISPE extraction coupled to HPLC-UV analysis was evaluated using olive oil spiked with dimethoate, as described in experimental part. Preliminary tests showed that the limits of detection and quantification were respectively 0.012 and 0.05 µg g⁻¹. As the maximum residue limit tolerated for dimethoate in olive products is 2 µg g⁻¹ [26], the olive samples were spiked with pesticide at concentrations ranging from 0.05–2 µg g⁻¹. Three oil samples were prepared for each concentration of dimethoate. 1 mL of spiked oil diluted in 9 mL hexane was loaded onto the MISPE cartridge. The cartridge was then washed using the optimized washing solution, and elution was performed using 1 mL of methanol. The elution solvent was evaporated and the residue was dissolved in 1 mL of water-acetonitrile (50:50) mixture and analyzed by HPLC. The results obtained for each sample are summarized in Table 6, showing a very satisfying average recovery rate of 94.4%. Control experiments based on extraction using blank polymers were performed in similar conditions, the chromatograms of dimethoate after extraction using MIP and blank polymer are presented in Fig. 4a and b, respectively. The extraction with blank polymer led to a very low recovery rate, confirming that most of the template was lost during the washing step. The same protocol was applied to extract the analogue molecule omethoate at 1 µg g⁻¹, leading to a recovery rate of 96 ± 4.8%.

To demonstrate the potential of MIP for the selective extraction of dimethoate in olive oil, the spiked samples were also extracted using conventional reverse phase SPE, leading to a recovery rate of 38%. As shown in Fig. 4c, many interfering compounds were co-extracted, thus preventing a thorough detection of dimethoate. In contrast, the MISPE clean-up of olive oil allowed removing most of the interfering compounds, leading to a selective identification and easy quantification of dimethoate. These results clearly illustrated that the developed MIP is an effective sorbent for the determination and extraction of dimethoate.

Table 6

Recovery rates obtained after MIP purification and HPLC analysis of dimethoate extracted from spiked olive oil (*n* = 3).

Spike concentration (µg g ⁻¹)	Recovery (%)	RSD (%)
2	92.3	2.98
1	94.5	3.03
0.5	97.2	2.2
0.1	89.8	3.68
0.05	98.02	1.85

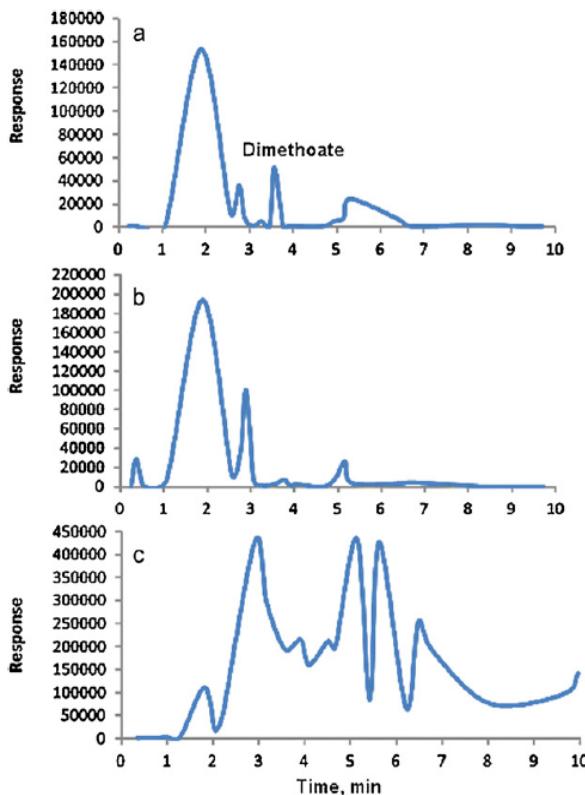


Fig. 4. Chromatograms of eluates obtained after extraction of 1 µg of dimethoate from olive oil diluted in hexane using MIP cartridge (a), NIP cartridge (b), and C18-silica cartridge (c) after liquid-liquid extraction with acetonitrile, UV detection at 220 nm. Retention time: 3.56 min.

4. Conclusion

This work shows the efficiency of computational modelling in the selection of suitable functional monomers for designing MIPs. Experimental validation confirmed the modelling predictions and showed that the polymer based on IA as functional monomer and omethoate as template molecule displays a very highest selectivity for dimethoate and its metabolite omethoate. The developed MISPE protocol allows the rapid and effective extraction of these pesticides from olive oil, even at concentrations much lower than

the tolerated MRL. Other attractive features include reduced solvent consumption and the possibility to regenerate and re-use the sorbent.

Acknowledgements

Authors acknowledge with gratitude "Volubilis" Hubert Curien programme and its financial support for the project MA/09/215 (Association biocapteurs-matériaux à empreinte moléculaire pour la détection des insecticides utilisés sur l'olivier).

References

- [1] P. Kandylis, A.S. Vekiaris, M. Kanellaki, N. Grati Kamoun, M. Msallem, Y. Kourkoutas, LWT Food Sci. Technol. 44 (2011) 1333.
- [2] B.E. Mazomenos, A. Pantazi-Mazomenou, D. Stefanou, IOBC-WPRS Bull. 25 (2002) 137.
- [3] E.G. Amvrazi, T.A. Albanis, Food Chem. 113 (2009) 253.
- [4] E.G. Amvrazi, T.A. Albanis, J. Agric. Food Chem. 56 (2008) 5700.
- [5] C.S. Tsoutsis, I.K. Konstantinou, Food Addit. Contam. A 25 (2008) 1225.
- [6] M. Guardia Rubio, A. Ruiz Medina, A. Molina Diaz, M.J. Ayora Canada, J. Agric. Food Chem. 54 (2006) 8538.
- [7] E. Botisi, P. Kormali, S. Kontou, A. Mourkojanni, E. Stavrakaki, D. Tsipi, Int. J. Environ. Anal. Chem. 84 (2004) 231.
- [8] M. Lopez-Mesas, M. Crespi, Grasas Aceites 51 (2000) 183.
- [9] S.M. Walters, Anal. Chim. Acta 236 (1990) 77.
- [10] P. Armishaw, R.G. Millar, J. AOAC Int. 76 (1993) 1317.
- [11] Ch. Lentza-Rizos, E.J. Avramides, Rev. Environ. Contam. Toxicol. 144 (1995) 111.
- [12] Y.S. Al-Degs, M.A. Al-Ghouti, A.H. El-Sheikh, J. Hazard. Mater. 169 (2009) 128.
- [13] N. Dujaković, S. Grujić, M. Radišić, T. Vasiljević, M. Laušević, Anal. Chim. Acta 678 (2010) 63.
- [14] T. Portolés, E. Pitarch, F.J. López, F. Hernández, J. Chromatogr. A 1218 (2011) 303.
- [15] Y. Wang, R. Du, Forensic Sci. Int. 198 (2010) 70.
- [16] X. Yang, H. Zhang, Y. Liu, J. Wang, Y.C. Zhang, A.J. Dong, H.T. Zhao, C.H. Sun, J. Cui, Food Chem. 127 (2011) 855.
- [17] H.Z. Zhu, Y.M. Cui, X.W. Zheng, H.R. Han, M.M. Yang, Anal. Chim. Acta 584 (2007) 166.
- [18] L. Rastrelli, K. Totaro, F. De Simone, Food Chem. 79 (2002) 303.
- [19] C. Yague, S. Bayarri, P. Conchello, R. Lázaro, C. Pérez-Arquillue, J. Agric. Food Chem. 53 (2005) 5105.
- [20] M. Lasakova, P. Jandera, J. Sep. Sci. 32 (2009) 799.
- [21] V. Pichon, J. Chromatogr. A 1152 (2007) 41.
- [22] V. Pichon, F. Chapuis-Hugon, Anal. Chim. Acta 622 (2008) 48.
- [23] A. Beltran, F. Borrull, P.A.G. Cormack, R.M. Marce, Trends Anal. Chem. 29 (2011) 1363.
- [24] S.A. Piletsky, K. Karim, E.V. Piletska, C.J. Day, K.W. Freebairn, C.H. Legge, A.P.F. Turner, Analyst 126 (2001) 1826.
- [25] F. Breton, R. Rouillon, E.V. Piletska, K. Karim, A. Guerreiro, I. Chianelli, S.A. Piletsky, Biosens. Bioelectron. 22 (2007) 1948.
- [26] European Food Safety Authority, EFSA J. 9 (2011) 2146.