

660.609714  
B6164  
1990

**canadienne-française  
pour l'avancement  
des sciences**

**1990**

# **La biotechnologie au Québec: travaux choisis**

**Publié sous la direction de  
Lucie Lamontagne**

**Département des sciences biologiques  
Université du Québec à Montréal**

**Édition:**

Association canadienne-française  
pour l'avancement des sciences  
2730, chemin de la Côte-Sainte-Catherine  
Montréal (Québec)

**Commandes téléphoniques:**

ACFAS  
(514) 342-1411  
Les cartes Master Card et Visa sont acceptées.  
Veuillez allouer trois semaines pour la livraison.

**Commandes postales:**

ACFAS (adresse ci-haut)  
(les individus doivent joindre le paiement à leur commande)

**Distribution en librairie:**

Diffusion Prologue  
1650, boul. Lionel-Bertrand  
Boisbriand (Québec) J7E 4H4  
Téléphone: (514) 434-0306      Ext.: 1-800-363-2864  
Télécopieur: (514) 434-2627      Ext.: 1-800-361-8088

**Saisie et mise en page:**

Colette Lesage

**Graphisme:**

La Touche Graphique

1990 ACFAS  
Dépôt légal 2<sup>e</sup> trimestre 1990  
Bibliothèque nationale du Québec  
Bibliothèque nationale du Canada  
ISBN 2-89245-103-5

D9005318





Bibliothèque Nationale du Québec



acfas

Association  
canadienne-française  
pour l'avancement  
des sciences

1990

# **La biotechnologie au Québec: travaux choisis.**

Communications présentées lors du 57e Congrès de l'ACFAS  
à l'Université du Québec à Montréal en mai 1989

Publié sous la direction de  
Lucie Lamontagne

Département des sciences biologiques  
Université du Québec à Montréal

TP  
248.195  
Q4656  
1990

## Table des matières

### **La cytoimmunothérapie et l'immunodéficience acquise suite à la maladie virale.**

Pierre Jolicoeur  
Lucie Lamontagne

Université du Québec à Montréal

### **Traitement anaérobie d'un effluent d'une usine de pâte thermomécanique**

Josée Perron, Jean-Guy Bisailon  
Marcel Paquet, Réjean Beaudet

Centre de recherche en microbiologie appliquée,  
Institut Armand-Frappier

et

Université du Québec à Chicoutimi

### **Développement et optimisation d'un biocapteur ampérométrique pour le glucose basé sur l'immobilisation physique de la glucose oxydase dans le polypyrrole**

Éric Brassard  
Daniel Bélanger  
Guy Fortier

Université du Québec à Montréal



## **“Avertissement” au fascicule sur les biotechnologies**

L'Acfas depuis quelques années a voulu accentuer le contrôle de la qualité des communications scientifiques présentées lors de ses congrès. C'est ainsi que lors du congrès tenu à l'Université du Québec à Montréal l'an dernier des procédures plus formelles d'arbitrage ont été instituées, à titre expérimental, dans un certain nombre de domaines. L'expérience a paru suffisamment convaincante pour qu'on étende ces procédures, à compter de cette année, à l'ensemble des activités scientifiques de nos congrès.

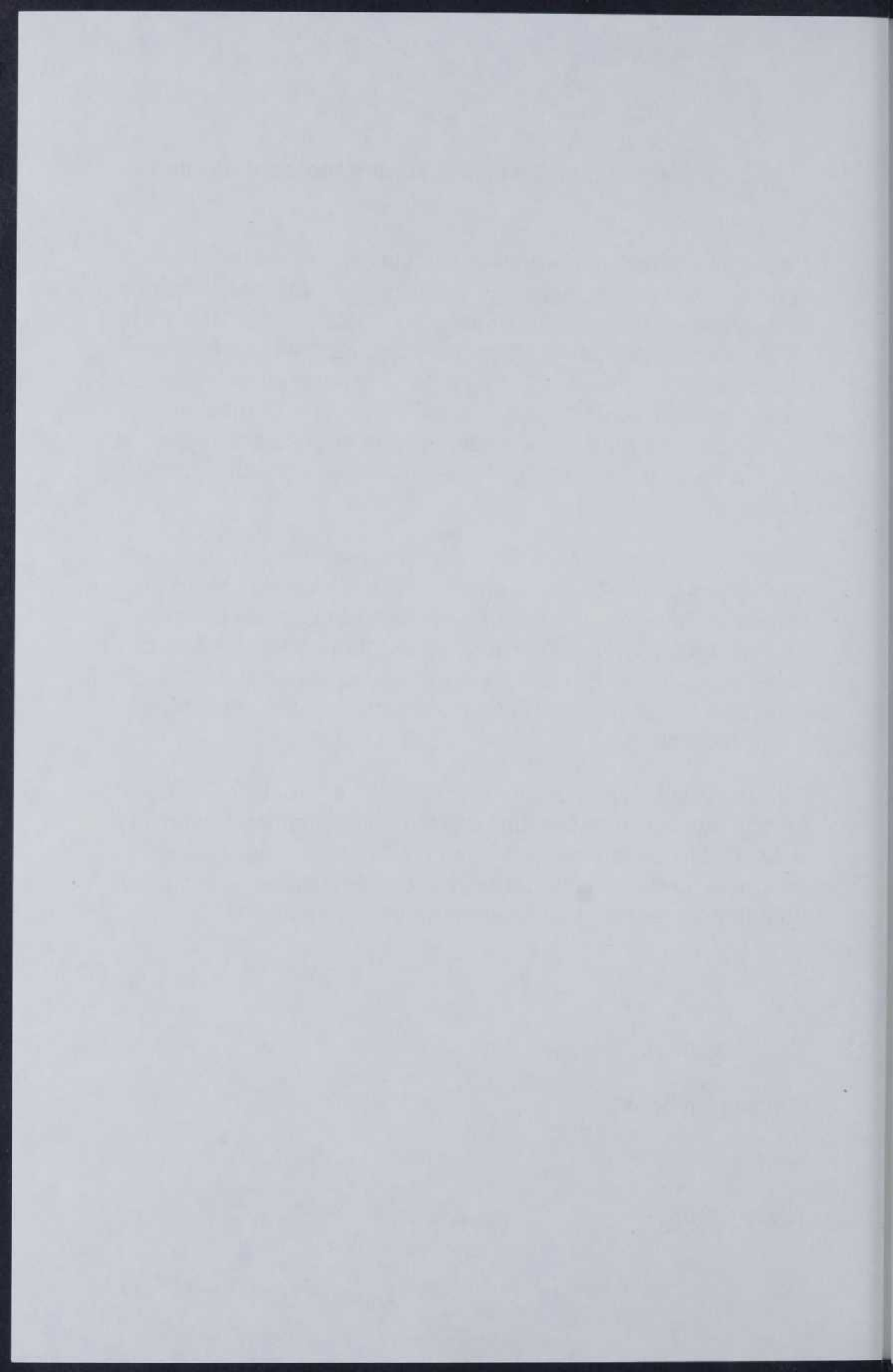
Les textes rassemblés à titre exceptionnel dans ce fascicule témoignent de la validité de cette entreprise. Il s'agit de présentations faites au dernier congrès dans un domaine de pointe, les biotechnologies. Il a paru d'autant plus intéressant de les rendre disponibles sous cette forme que, retenues par le comité de sélection, toutes reflètent l'apport important d'étudiants gradués à leur réalisation.

Cette publication, sous la direction de la professeure Lucie Lamontagne que nous tenons ici à remercier, manifeste bien qu'il est possible de tenir la barre haute sans décourager les initiatives; elle souligne aussi les exigences scientifiques et la rigueur dont témoignent les jeunes chercheurs de la relève.

Le président de l'Acfas,

Camille Limoges

Hiver 1990



**La cytoimmuno thérapie et l'immunodéficience acquise  
suite à la maladie virale**

**Pierre Jolicoeur  
Lucie Lamontagne**

**Département des sciences biologiques,  
Université du Québec à Montréal**

**Introduction**

L'expression de la pathogénicité virale est le résultat d'un déséquilibre entre la réplication virale et les mécanismes de défenses immunitaires de l'hôte. La capacité de l'hôte à effectuer une réponse humorale et cellulaire anti-virale adéquate repose essentiellement sur une lymphopoïèse B et T normale qui ont lieu respectivement dans la moelle osseuse (1) et le thymus (2). L'élimination de l'infection virale par l'hôte nécessite la participation de plusieurs cellules immunitaires dont les lymphocytes B ( $cu^+$   $su^+$ ), responsables de la réponse à médiation humorale et sécrétant les anticorps capables d'induire la lyse des cellules infectées en présence de complément ou de bloquer la fixation des virus aux récepteurs spécifiques des cellules cibles (3), et les

lymphocytes T cytotoxiques (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>) qui détruisent les cellules infectées (4) alors que les lymphocytes T collaborateurs (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>) permettent, par la production de lymphokines, d'initier une réponse inflammatoire facilitant l'élimination virale (5). Ainsi, l'incapacité de l'hôte à éliminer l'infection virale favorise le développement de la persistance virale et de l'infection chronique associée ou non à une immunodéficience. Cette immunodéficience est particulièrement importante lorsqu'il s'agit d'infection par un virus lymphotrope (4).

Le principe de la cytoimmunothérapie repose essentiellement sur le transfert de cellules immunitaires syngéniques (6). Ainsi, l'administration de ces cellules permet à l'hôte, immunodéficient, de compenser la perte des cellules immunocompétentes afin d'éliminer l'infection virale. La cytoimmunothérapie a été utilisée pour le traitement de certaines infections virales induites notamment par le virus de la chorioméningite lymphocytaire (7), le virus herpes simplex (8) ou le virus influenza (9).

Le virus de l'hépatite murine de type 3 (MHV3), un coronavirus, représente un excellent modèle d'étude des interactions virus-lymphocytes impliquées dans le développement de l'immunodéficience. Les souris semi-susceptibles, tel que la F1 (C57BL/6 x A/J), ayant survécues à la maladie aiguë, développent une maladie chronique caractérisée par une persistance virale, une immunodéficience, associée à une perte importante des cellules de la moelle osseuse, de la rate, du thymus et du sang périphérique, ainsi que l'apparition d'une paralysie postérieure (10-12). De plus, une chute progressive de toutes les classes d'immunoglobulines sériques a été observée (13). Également, la réponse d'hypersensibilité de type retardée et la culture lymphocytaire mixte ont été altérées chez ces souris (10, 14).

La présente étude a été entreprise afin d'évaluer l'immunodéficience cellulaire acquise au cours de l'infection chronique, de tenter de compenser les déficits cellulaires par la cytoimmunothérapie à l'aide des différentes sous-populations de lymphocytes B et T et de rétablir une réponse humorale normale.

## Matériel et méthodes

### Souris

Des souris F1 (C57BL/6 x A/J) femelles âgées de quatre à six semaines, ont été obtenues de Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine, U.S.A.). L'absence d'anticorps anti-MHV a été vérifiée par la technique ELISA en utilisant un surnageant de culture de MHV3 sur cellules L2 (fibroblastes de souris C3H en lignée continue) comme antigène. Les souris ont été gardées sous atmosphère stérile, dans une animalerie autonome (Forma Scientific, Marietta, OH, U.S.A.).

### Virus

La souche MHV3 est un virus cloné (15) et cultivé *in vitro* sur des cellules L2. Les propriétés pathogéniques de ce virus ont été vérifiées régulièrement. Le virus a été injecté à des souris par voie intrapéritonéale (i.p.), à une dose de  $10^3$  TCID<sub>50</sub> dans un volume de 0,1 ml de PBS. Des souris, formant les groupes témoins, ont reçu une injection i.p. de PBS.

### Récolte des cellules du thymus et de la moelle osseuse

Les souris ont été euthanasiées par dislocation cervicale. Les cellules du thymus ont été obtenues par dissociation des tissus thymiques puis, resuspendues dans 10 ml de milieu MEM (Minimal essential medium, GIBCO Laboratories, Grand Island, N.Y., U.S.A.) contenant 10% de sérum de veau fœtal (SVF), 100 unités/ml de pénicilline et 100 ug/ml de streptomycine. Les cellules de moelle osseuse ont été récoltées suite à un quadruple lavage de l'intérieur des fémurs avec 1 ml de MEM avec SVF et antibiotiques. Les particules de tissus non-dissociés ont été éliminées par sédimentation sur un coussin de 1 ml de SVF pendant 5 minutes. Par la suite, les suspensions cellulaires ont été centrifugées et resuspendues dans 1 ml de MEM avec SVF et antibiotiques. Les suspensions cellulaires ont été comptées électro-

niquement (Coulter counter, model ZM, Coulter electronics, Hialeah, FL) et la viabilité cellulaire a été vérifiée à l'aide du test d'exclusion au bleu de trypan.

### Détermination des lymphocytes B matures et des sous-populations de lymphocytes T

Les techniques de marquage des chaînes mu de surface chez les lymphocytes B ont été effectuées, par immunofluorescence, selon les méthodes décrites par Park et Osmond (1). Les sous-populations des cellules thymiques ont été caractérisées par la présence des marqueurs de surface CD4 et CD8. Une suspension de cellules thymiques ( $4 \times 10^7$  cellules/ml) a été incubée avec 100  $\mu$ l d'anticorps anti-CD4 de rat couplé à la FITC (Dimension Laboratories, Mississauga, Ontario, Canada) pendant 30 minutes sur glace. Les cellules ont été lavées deux fois par centrifugation sur une colonne de SFV à 200 x g pendant 7 minutes à 4°C. Les cellules ont été incubées avec 100  $\mu$ l d'anticorps anti-CD8 (Dimension Laboratories, Mississauga, Ontario, Canada) pendant 30 minutes sur glace. Après la période de lavage, les cellules ont été resuspendues et incubées avec 100  $\mu$ l d'anticorps anti-IgG-TRITC de souris (Cappel Biomedical, Malvern, PA, U.S.A.) pendant une période additionnelle de 30 minutes. Les cellules ont été lavées et resuspendues dans 1 ml de NaCl 0.15 M contenant du EDTA disodium 2,7mM additionné de 5% de ABS. Les cellules ont été fixées dans une solution d'acide acétique/éthanol absolu pendant 12 minutes sur glace, puis lavées et conservées toute la nuit dans du PBS. Les lames ont été montées en utilisant un milieu contenant 90% de glycérol (Fisher Scientific Co., Montréal, Québec, Canada) dans du PBS pH 8.0 et 0,1% de p-phenylenediamine (Fisher Scientific Co., Montréal, Québec, Canada). Le nombre absolu de cellules positives a été déterminé à partir du pourcentage de cellules positives (sur 1,000 cellules) et du compte cellulaire total de la moelle osseuse ou du thymus.

### Cytoimmuno thérapie

Des souris ont reçu, par voie i.p, une injection de  $10^3$  TCID<sub>50</sub> de virus MHV3 dans un volume de 0,1 ml de PBS. Les souris du groupe témoin ont reçu, par voie i.p., une injection d'un volume égal de PBS. Après 15 jours post-infection, des souris ont reçu par voie intraveineuse (i.v.) une injection de différentes combinaisons de sous-populations lymphocytaires suivantes, purifiées par immunoadhérence (16) et cytotoxicité à l'aide des anticorps spécifiques et du complément: lymphocytes T CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>, lymphocytes T CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>, lymphocytes B su<sup>+</sup> à une concentration de  $2,0 \times 10^6$  cellules dans un volume de 0,1 ml de PBS. Des souris chroniquement infectées mais non-traitées avec les sous-populations cellulaires ont aussi été étudiées. Aux temps 0 et 30 jours post-traitement, des groupes de trois souris ont été euthanasiés et les paramètres suivants ont été analysés: (i) nombres absolus des différentes sous-populations lymphocytaires B et T et (ii) détermination et quantification des classes des immunoglobulines sériques à l'aide du test ELISA (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, U.S.A.).

### Tests statistiques

Les pourcentages et les nombres absolus ont été évalués par le test de la comparaison des moyennes (t de Student). Dans le cas de l'inégalité des variances, le test t modifié de Student a été utilisé. De plus, les rapports ont été évalués par le test U de Wilcoxon-Mann-Withney (17).

## Résultats

### Analyse des lymphocytes B de la moelle osseuse et des sous-populations lymphoïdes du thymus chez des souris F1(C57BL/6 x A/J) infectées par le virus MHV3

Il a été démontré que l'infection par le MHV3 induit une atrophie importante de la rate ainsi qu'une perte considérable des lymphocytes B et T (18). Cette perte peut être causée par une diminution des lymphocytes B et T dans la moelle osseuse et le thymus respectivement. Afin de vérifier cette hypothèse, les nombres absolus des lymphocytes B et des sous-populations de lymphocytes T ont été évalués, dans la moelle osseuse et le thymus, à 0 et 30 jours post-infection chez des souris F1(C57BL/6 x A/J). Des groupes de trois souris ont été infectés par voie i.p. avec  $10^3$  TCID<sub>50</sub> du virus MHV3. Les nombres absolus des lymphocytes B et T ont été évalués par immunofluorescence à double marquage.

Une baisse importante du nombre absolu des lymphocytes B (cu<sup>+</sup>su<sup>+</sup>) au jour 30 post-infection ( $p \leq 0,001$ ) a été observée chez les souris infectées par le virus MHV3 comparativement aux souris non-infectées (Tableau I). Également, des diminutions des nombres absolus des thymocytes CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> ( $p \leq 0,05$ ), CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> et CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> ( $p \leq 0,01$ ) ont été observées dans le thymus des souris infectées par le virus MHV3. Le rapport CD4/CD8, effectué à partir des nombres absolus des thymocytes CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> et CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>, est diminué chez les souris infectées par le virus MHV3.

**TABLEAU I.** Nombre absolu de lymphocytes B matures ( $cu^{+}su^{+}$ ) de la moelle osseuse et des sous-populations de thymocytes chez des souris F1(C57BL/6 x A/J) infectées par le virus MHV3

Lymphocytes	Virus	Temps post-infection (jours)	
		0	30
B ( $cu^{+}su^{+}$ )	Non-infecté	$2,65 \pm 0,10^a$	$2,67 \pm 0,10$
	MHV3	$2,70 \pm 0,10$	$1,10 \pm 0,07$
T ( $CD4^{+}CD8^{+}$ )	Non-infecté	$3,92 \pm 0,30$	$4,01 \pm 0,30$
	MHV3	$3,96 \pm 0,40$	$3,00 \pm 0,30$
T ( $CD4^{+}CD8^{-}$ )	Non-infecté	$0,86 \pm 0,08$	$0,88 \pm 0,09$
	MHV3	$0,80 \pm 0,08$	$0,53 \pm 0,04$
T ( $CD4^{-}CD8^{+}$ )	Non-infecté	$0,40 \pm 0,04$	$0,44 \pm 0,04$
	MHV3	$0,40 \pm 0,04$	$0,29 \pm 0,01$
Rapport ( $CD4/CD8$ )	Non-infecté	$2,10 \pm 0,10$	$2,17 \pm 0,11$
	MHV3	$2,08 \pm 0,10$	$1,68 \pm 0,06$

<sup>a</sup>) nombre absolu de lymphocytes ( $\times 10^6$ )

Analyse des lymphocytes B dans la moelle osseuse des souris F1(C57BL/6 x A/J) infectées par le virus MHV3 et traitées avec des lymphocytes B matures

Afin de vérifier si l'administration de lymphocytes B permet de compenser la perte de cette population cellulaire dans la moelle osseuse de souris infectées par le virus MHV3, le nombre absolu des lymphocytes B ( $cu^{+}su^{+}$ ) a été déterminé à 0 et 30 jours post-traitement par immunofluorescence à double marquage, chez des souris infectées et traitées avec des lymphocytes B. Les résultats montrent que l'administration de lymphocytes B a induit une augmentation significative de lymphocytes B matures de la moelle osseuse à 30 jours post-traitement ( $p \leq 0,05$ ) (Tableau II).

**TABLEAU II.** Nombre absolu de lymphocytes B dans la moelle osseuse des souris F1(C57BL/6 x A/J) infectées par le virus MHV3 et non-traitées ou traitées, à 15 jours post-infection avec des lymphocytes B matures (cu<sup>+</sup>su<sup>+</sup>)

Traitement	Virus	<u>Temps post-traitement (jours)</u>	
		0	30
Non-traité	Non-infecté	2,60 ± 0,10 <sup>a</sup>	2,68 ± 0,10
	MHV3	1,79 ± 0,08	1,84 ± 0,08
B (cu <sup>+</sup> su <sup>+</sup> )	MHV3	1,86 ± 0,08	2,64 ± 0,10

<sup>a</sup>) Nombre absolu (x 10<sup>6</sup>)

Analyse des sous-populations de lymphocytes thymiques des souris F1(C57BL/6 x A/J) infectées par le virus MHV3 et traitées avec des sous-populations de lymphocytes T

Les nombres absolus des sous-populations de lymphocytes T ont également été déterminés chez des souris chroniquement infectées et traitées avec les lymphocytes purifiés CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> et CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>. Les cellules du thymus ont été récoltées à 0 et 30 jours post-traitement et les sous-populations de lymphocytes T ont été analysées par immunofluorescence à double marquage. La cytoimmuno thérapie à l'aide de lymphocytes CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> a induit une augmentation significative du nombre absolu de lymphocytes CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> à 30 jours post-traitement ( $p \leq 0,05$ ) mais n'a pas totalement compensé le déficit causé par l'infection virale (Tableau III). L'administration de lymphocytes CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> a permis de compenser le déficit de cette population cellulaire en induisant une augmentation significative du nombre absolu de lymphocytes CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> à 30 jours post-traitement ( $p \leq 0,05$ ).

**TABLEAU III.** Nombre absolu de lymphocytes thymiques CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> et CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> chez des souris F1(C57BL/6 x A/J) infectées et non-traitées ou traitées, à 15 jours post-infection, avec des sous-populations de lymphocytes T

Sous-populations thymiques	Traitement	Virus	Temps post-infection (jours)	
			0	30
CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup>	Aucun	Non-infecté	0,87 ± 0,09 <sup>a</sup>	0,88 ± 0,09
	Aucun	MHV3	0,50 ± 0,05	0,56 ± 0,06
	CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup>	MHV3	0,51 ± 0,05	0,72 ± 0,08
	CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup>	MHV3	0,31 ± 0,04	0,37 ± 0,04
CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup>	Aucun	Non-infecté	0,41 ± 0,04	0,40 ± 0,04
	Aucun	MHV3	0,30 ± 0,03	0,26 ± 0,03
	CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup>	MHV3	0,30 ± 0,03	0,29 ± 0,03
	CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup>	MHV3	0,30 ± 0,04	0,39 ± 0,04

<sup>a</sup>) Nombre absolu (x 10<sup>6</sup>)

Analyse des rapports des thymocytes CD4/CD8 de souris F1(C57BL/6 x A/J) infectées par le virus MHV3 et traitées avec des sous-populations de lymphocytes B et T

Le Tableau IV montre que seule l'injection de lymphocytes CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> a permis de compenser, au jour 30 post-traitement, la chute du rapport CD4/CD8 ( $p \leq 0,01$ ). Aucune correction des rapports CD4/CD8 n'a été observée suite à l'administration de lymphocytes CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> ou B.

**TABLEAU IV.** Rapport des lymphocytes CD4/CD8 thymiques des souris F1 (C57BL/6 x A/J) infectées par le virus MHV3 et non-traitées ou traitées, à 15 jours post-infection, avec différentes sous-populations de lymphocytes B et T

Traitement	Virus	<u>Temps post-traitement (jours)</u>	
		0	30
Aucun	Non-infecté	2,10 ± 0,10 <sup>a</sup>	2,17 ± 0,10
Aucun	MHV3	1,70 ± 0,08	1,76 ± 0,08
CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup>	MHV3	1,65 ± 0,08	1,96 ± 0,09
CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup>	MHV3	1,70 ± 0,08	1,41 ± 0,05
B(cu <sup>+</sup> su <sup>+</sup> )	MHV3	1,70 ± 0,07	1,67 ± 0,07

<sup>a</sup>) Rapport CD4/CD8

Pourcentage des différentes classes d'immunoglobulines sériques chez des souris F1 (C57BL/6 x A/J) infectées par le virus MHV3 et traitées avec différentes sous-populations de lymphocytes B et T

Afin de vérifier si l'administration de sous-populations de lymphocytes B ou T permet de restaurer une réponse humorale normale, le pourcentage des différentes classes d'immunoglobulines sériques a été déterminé, par une méthode ELISA, à 0 et 30 jours post-traitement. L'administration de lymphocytes CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> a permis d'augmenter de façon très significative les pourcentages des différentes classes d'anticorps sériques à 30 jours post-traitement ( $p \leq 0,001$ ) (Tableau V). L'injection de lymphocytes B ou CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>, par contre, n'a pas permis de compenser l'hypogammaglobulinémie.

**TABLEAU V.** Pourcentage des différentes classes d'immunoglobulines sériques des souris F1 (C57BL/6 x A/J) infectées par le virus MHV3 et non-traitées ou traitées, à 15 jours post-infection, avec différentes sous-populations de lymphocytes B et T

Traite- ment	Temps post- traitement (jours)	Classes d'immunoglobulines sériques (%) <sup>a</sup>					
		IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	IgM	IgA
Aucun	0	46±2,6	43±2,5	86±4,8	45±2,6	86±5,0	39±2,1
	30	44±2,4	44±2,6	88±5,0	48±2,9	88±4,8	40±2,3
MHV3	0	20±1,2	18±1,2	35±1,8	29±1,6	25±1,9	17±1,2
	30	17±1,0	19±1,2	42±2,4	30±1,5	26±1,7	18±1,2
CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup>	0	21±1,2	19±1,2	33±1,7	36±2,0	23±1,3	18±1,3
	30	61±3,0	63±3,1	75±3,9	71±4,1	73±4,2	30±2,0
CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	0	5±0,02	15±1,3	16±1,1	17±1,3	20±1,3	17±1,3
	30	7±0,03	5±0,03	17±1,1	12±1,2	19±1,2	18±1,4
B(cu <sup>+</sup> su <sup>+</sup> )	0	8±0,03	6±0,02	13±1,3	12±0,9	20±1,3	17±1,4
	30	5±0,02	14±0,06	28±1,5	15±1,0	26±1,2	18±1,2

<sup>a</sup>) Le pourcentage des différentes classes d'immunoglobulines sériques a été déterminé par un test ELISA.

## Discussion

L'infection des souris F1 (C57BL/6 x A/J) par le virus MHV3 a induit une perte importante des lymphocytes B matures au niveau de la moelle osseuse ainsi que des chutes de toutes les sous-populations de lymphocytes T thymiques accompagnées d'un déséquilibre du rapport CD4/CD8.

La perte des lymphocytes B et T est en accord avec les observations de Lamontagne *et al.* (12) au sujet de la perte importante de la cellularité de la moelle osseuse et de l'atrophie du thymus. De plus, l'incapacité de la moelle osseuse et du thymus à produire des lymphocytes B et T ne permet pas de compenser la perte des lymphocytes B et T au niveau de la rate (18). La baisse du nombre de lymphocytes B matures dans la moelle osseuse est, en partie, responsable de la diminution des taux d'anticorps sériques et explique l'hypogammaglobulinémie observée par Leray *et al.* (13) chez la souris chroniquement infectée. Aussi, la perte des lymphocytes B et T ainsi que la chute du rapport CD4/CD8 a pour effet de diminuer la collaboration cellulaire et de contribuer au développement de l'immunodéficience humorale et de maintenir l'animal dans un état suppressif, tel que démontré par la chute du rapport CD4/CD8.

L'administration des sous-populations de lymphocytes B et T a permis de compenser les déficits cellulaires observés chez des souris F1(C57BL/6 x A/J) infectées par le virus MHV3. Cette compensation s'est traduite par des augmentations du nombre absolu de lymphocytes B matures ( $cu^{+}su^{+}$ ) au niveau de la moelle osseuse, de lymphocytes T  $CD4^{+}CD8^{-}$  et  $CD4^{-}CD8^{+}$  au niveau du thymus et du rapport CD4/CD8. L'administration des lymphocytes B ou T a eu pour effet de faire augmenter le nombre des populations cellulaires correspondantes. Les effets du transfert de lymphocytes ont déjà été étudiés chez des patients atteints du SIDA (19-22). Les résultats montrent une nette amélioration du nombre de lymphocytes  $CD4^{+}$ , cependant, cette augmentation n'a été que transitoire puisque le taux de lymphocytes  $CD4^{+}$  a chuté de 1 à 2 mois post-traitement (19).

Le transfert de lymphocytes  $CD4^{+}CD8^{-}$  seulement a permis une augmentation des pourcentages des différentes classes d'immunoglobulines sériques démontrant qu'un rétablissement de la réponse humorale s'est effectué. La présence de lymphocytes  $CD4^{+}CD8^{-}$  engendre une diminution de l'état suppressif de l'hôte en aug-

mentant le rapport CD4/CD8 afin de restaurer une réponse humorale adéquate. Doll et Johnson (23) ont déjà observé le recouvrement de la réponse humorale suite à l'administration de lymphocytes T spléniques à des souris nues infectées par le virus de la stomatite vésiculaire. L'administration de lymphocytes CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> seuls aurait pour effet de maintenir et d'aggraver l'état suppressif de l'hôte, ne pouvant ainsi effectuer de réponses humorales. L'incapacité de l'hôte à générer une réponse humorale normale démontre que l'immunodéficiência humorale résulte principalement de l'état suppressif de l'hôte dû à la perte des lymphocytes CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> et à un taux plus élevé de lymphocytes CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> plutôt qu'à la perte de lymphocytes B fonctionnels. Ce résultat confirme les observations de Leray *et al.* (13) à l'effet que les lymphocytes spléniques résiduels chez la souris chroniquement infectée sont encore fonctionnels.

Des travaux subséquents seront entrepris afin de mieux cerner les mécanismes cellulaires favorisant le recouvrement de la réponse immune et leurs conséquences immunopathologiques.

## Références

1. Park, Y-H. and Osmond, D.G. 1987. *J. Exp. Med.* **165**: 444-451.
2. Adkins, B., Mueller, C., Okada, C.Y., Reichert, R.A., Weissman, I.L. and Spangrude, G.J. 1987. *Ann. Rev. Immunol.* **5**: 325-365.
3. Sissons, J.G.P. and Oldstone, M.B.A. 1980. *Adv. Immunol.* **29**: 209-259.
4. Borysiewicz, L.K. and Sissons, P.J.C. 1986. *Clin. Immunol. All.* **6**: 159-187.
5. Liew, F.Y. 1982. *Immunol. Today* **3**: 18-23.
6. Oldstone, M.B.A. 1987. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **134**: 211-229.
7. Oldstone, M.B.A., Blount, P., Southern, P.J. and Lampert, P.W. 1986. *Nature* **321**: 239-243.
8. Sethi, K.K., Omata, Y. and Schneeweiss, K.E. 1983. *J. Gen. Virol.* **64**: 443-447.

9. Lin, Y.L. and Askonas, B.A. 1981. *J. Exp. Med.* 154: 225-234.
10. LePrévost, C., Levy-Leblond, B., Virelizier, J.L. and Dupuy, J.M. 1975. *J. Immunol.* 117: 221-225.
11. LePrévost, C., Virelizier, J.L. and Dupuy, J.M. 1975. *J. Immunol.* 115: 640-645.
12. Lamontagne, L., Dupuy, C. Leray, D., Chausseau, J.P. and Dupuy, J.M. 1985. *Prog. Leuk. Biol.* 1: 29-42.
13. Leray, D., Dupuy, C. and Dupuy, J.M. 1982. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 23: 223-228.
14. Krzystyniak, K. and Dupuy, J.M. 1983. *Biomed. Pharmacother.* 37: 68-74.
15. Dupuy, J.M. and Rodrigue, D. 1981. *Intervirology* 16: 116-117.
16. Wysocki, L.J. and Sato, V.L. 1978. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 2844-2849.
17. Scherrer, B. 1984. *Biostatistique*. G. Morin (éd.), Montréal.
18. Lamontagne, L., Descoteaux, J.P. and Jolicoeur, P. 1989. *J. Immunol.* 142: 4458-4465.
19. Lane, H.C., Masur, H., Longo, D.L., Klein, H.G. and Rook, A.H. 1984. *N. Engl. J. Med.* 311: 1099-1102.
20. Mitsuyasu, R., Volberding, P., Groopman, J. and Champlin, R. 1984. *J. Cell. Biochem.* 8A: 19-26.
21. Hasset, J.M., Zaroulis, C.G., Greenberg, M.K., Fortino, M. and Siegal, F.P. 1983. *N. Engl. J. Med.* 309: 665.
22. Vilmet, E., Vittecoq, D., Autran, B., Rozenbaum, W., Dormont, D., Rabian, C., Bourhis, J.H., Monsuez, J.J., Benbunan, M. and Gluckman, E. 1987. *Ann. Inst. Pasteur/Immunol.* 138: 269-273.
23. Doll, S.C. and Johnson, T.C. 1988. *J. Gen. Virol.* 69: 1969-1977.

**Traitement anaérobie d'un effluent d'une  
usine de pâte thermomécanique**

**Josée Perron<sup>1</sup>, Jean-Guy Bisailon<sup>1</sup>,  
Marcel Paquet<sup>2</sup>, Réjean Beaudet<sup>1</sup>**

**Centre de recherche en microbiologie appliquée,  
Institut Armand-Frappier<sup>1</sup> et  
Université du Québec à Chicoutimi<sup>2</sup>**

Le procédé thermomécanique de fabrication de pâte est de plus en plus utilisé au Québec et les effluents générés par ce procédé sont toxiques à cause de la présence d'importantes quantités d'acides résiniques. L'effluent que nous avons utilisé avait une demande chimique en oxygène (DCO) de 5,9 g/l et contenait 32,0 mg/l d'acides résiniques. Cet effluent s'est avéré traitable anaérobiquement. Un consortium de bactéries anaérobies a été adapté à cet effluent. Nous avons utilisé des géotextiles dans les cultures comme support pour permettre l'attachement des micro-organismes et leur développement sous forme d'un biofilm. Le traitement de l'effluent avec un tel procédé nous a permis d'obtenir les pourcentages de réduction suivants: acides gras insaturés, 100; sucres, 69; acides résiniques, 58; DCO, 38; tannin-lignine, 0. Les acides résiniques qui sont les principales substances toxiques de l'effluent n'ont pas tous été dégradés au même degré. Ces résultats démontrent la faisabilité du traitement anaérobie et que des travaux additionnels sont requis afin d'en augmenter la performance.

## Introduction

L'industrie des pâtes et papiers est un des principaux secteurs d'activités économiques du Québec et du Canada. C'est aussi un secteur qui génère un impact considérable sur l'environnement. Dans ces usines, le procédé thermomécanique (PTM) est de plus en plus utilisé pour la production de pâte. Les effluents provenant d'une usine PTM peuvent causer des dommages considérables aux cours d'eau s'ils ne sont pas traités (1). Ces effluents contiennent de fortes concentrations de composés organiques dissous incluant des acides résiniques et gras qui sont toxiques pour la vie aquatique (2).

La plupart des systèmes utilisés pour traiter les effluents PTM sont des procédés de traitement biologiques aérobie. Le traitement anaérobie d'effluents PTM est une alternative valable au traitement aérobie car il a le potentiel de produire des effluents de qualité comparable et ce à moindre coût. Il existe peu de travaux concernant la traitabilité anaérobie d'un effluent PTM. Jurgensen *et al.* (2) ont démontré la traitabilité des effluents PTM avec des réacteurs anaérobies. Leur traitement en continu d'une eau blanche PTM a donné une diminution de 60 à 80% de la DBO soluble, de 30 à 60% de la DCO soluble, plus de 90% des acides volatils et de 60 à 70% des sucres. Dans deux autres études effectuées avec des effluents PTM, la DBO et la DCO ont été réduites de façon comparable suite à un traitement anaérobie (3, 4). À notre connaissance, la dégradation des acides résiniques en conditions anaérobies n'a pas été rapportée et étudiée.

Dans ce travail, nous avons vérifié la traitabilité d'un effluent PTM et évalué la performance d'un traitement anaérobie sur les principales familles de composés retrouvées dans cet effluent et plus particulièrement sur les acides résiniques.

## Matériels et méthodes

### Provenance et conservation de l'effluent

Nous avons utilisé un effluent d'une usine de pâte thermomécanique provenant du filtrat du 3<sup>e</sup> stade d'épuration de la pâte. L'échantillon, recueilli dans des contenants de verre d'une capacité de 20 litres, a été entreposé à 4°C en absence d'oxygène.

### Traitabilité de l'effluent

La traitabilité anaérobie de l'effluent a été vérifiée en déterminant son potentiel méthane (BMP) et sa toxicité (ATA). Ces déterminations ont été effectuées à l'aide de méthodes semblables à celles utilisées par Cornacchio *et al.* (5). Les différentes cultures ont été inoculées avec une boue activée provenant d'un digesteur anaérobie de l'usine de traitement des eaux usées de la ville de Deux-Montagnes. Le volume de gaz produit pour chacune des cultures a été mesuré en fonction du temps d'incubation.

### Caractérisation de l'effluent

L'effluent a été caractérisé à l'aide de méthodes standards décrites dans le "Standard methods for the Examination of Water and Wastewater" (6). Les sucres ont été mesurés par la technique utilisant l'acide phénol-sulfurique (7) et les acides gras volatils ont été dosés par chromatographie en phase gazeuse (CG) après extraction de l'éther. Les acides résiniques et les acides gras insaturés ont aussi été dosés par CG à l'aide d'une méthode semblable à celle développée par Voss et Rapsomatiotis (8).

### Adaptation d'un consortium à l'effluent

Un consortium de bactéries anaérobies a été constitué en mélangeant dans des proportions égales de la boue activée du digesteur anaérobie de la ville de Deux-Montagnes, un échantillon du lit de la rivière Donohue et du lisier de porc. Ce consortium a été inoculé dans un milieu de culture chimiquement défini semblable à celui utilisé par Cornacchio *et al.* (1986) additionné de protéose peptone (0,2% p/v) et d'effluent (60% v/v). Ces cultures ont été incubées à 37°C sous un atmosphère contenant un mélange de gaz 80% N<sub>2</sub> : 10% CO<sub>2</sub> : 10% H<sub>2</sub>. Le consortium a été adapté à l'effluent PTM par repiquages successifs dans ce milieu. Les repiquages des cultures ont été effectués lorsque la production de gaz ralentissait.

### Traitement de l'effluent

Le traitement de l'effluent a été effectué dans des bouteilles sérologiques contenant un milieu de culture similaire à celui décrit précédemment. Nous avons incorporé des géotextiles (Texel Inc., Beauce-Nord, Québec) dans les bouteilles afin que les micro-organismes puissent adhérer à ces supports et s'y développer pour former un biofilm. Les cultures ont été incubées sous des conditions semblables à celles décrites auparavant. Lorsque la production de méthane des cultures ralentissait, 60% du milieu de culture était vidangé et remplacé par du milieu frais. Cette procédure a été effectuée à 6 reprises, ce qui équivaut à un total de 141 jours d'incubation des textiles. Après cette période nous avons considéré qu'un biofilm s'était développé et la totalité du milieu de culture a alors été remplacée par du milieu frais. Ce n'est qu'à partir de ce moment que nous avons évalué les effets du traitement. Pour ce faire, nous avons caractérisé le milieu de culture après 0 et 28 jours d'incubation à l'aide des différentes analyses utilisées pour la caractérisation de l'effluent.

## Résultats

### Traitabilité de l'effluent

Dans le test BMP, l'inoculation de la boue activée dans l'effluent PTM a engendré la production de gaz en conditions anaérobies et cette dernière a varié en fonction des temps d'incubation des cultures (Fig. 1). Un maximum de 38 ml de gaz a été produit après 13 jours d'incubation de ces cultures. Par contre, l'inoculation de la boue activée dans l'eau n'a produit qu'un maximum de 6 ml de gaz. La différence entre ces volumes de gaz, soit 32 ml, serait attribuable à la dégradation de l'effluent.

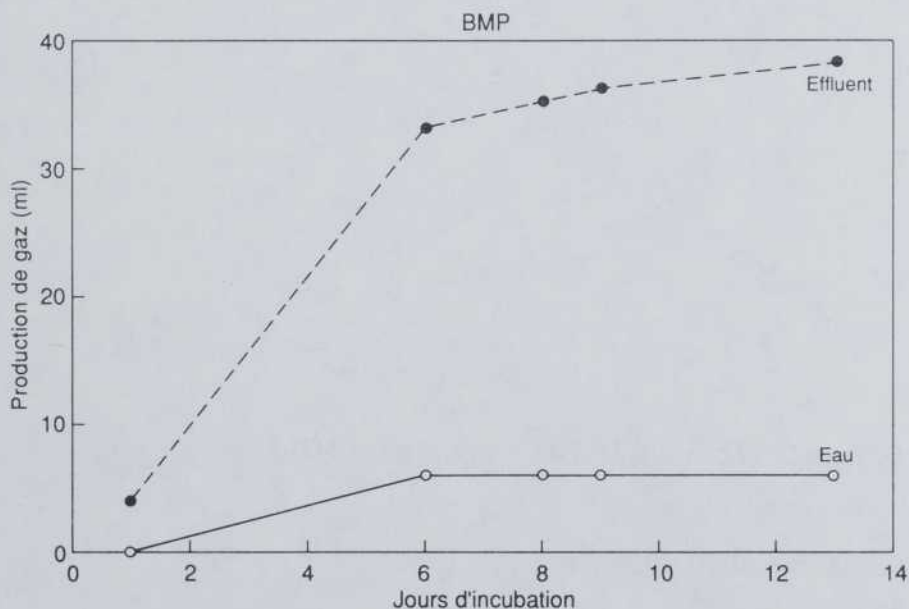
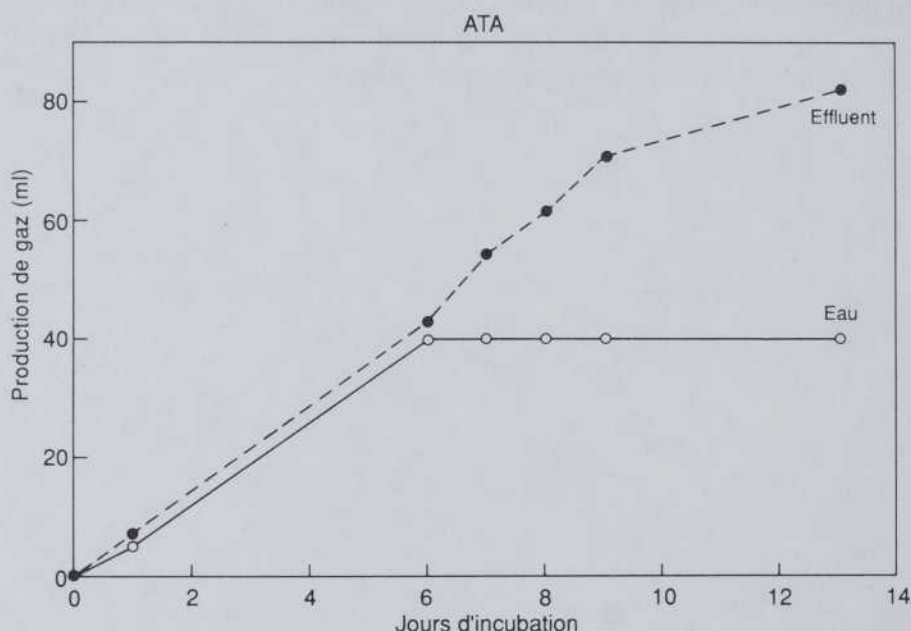


Figure 1. Potentiel méthane (BMP) de l'effluent PTM

En ce qui concerne le test ATA, les courbes de production de gaz pour les cultures contenant des acides gras volatils en présence d'effluent et en présence d'eau sont similaires jusqu'au 6<sup>e</sup> jour d'incubation (Fig. 2). Par la suite il n'y a plus de production de gaz dans les cultures contenant de l'eau alors que cette production se poursuit dans les cultures contenant de l'effluent.



**Figure 2. Toxicité (ATA) de l'effluent PTM**

### Caractérisation de l'effluent

L'effluent a été caractérisé chimiquement (Tableau I). Les concentrations des solides totaux et en suspension dans l'effluent brut sont élevées. La demande chimique en oxygène (DCO) de l'effluent brut est 14 fois plus grande que la demande biochimique en oxygène (DBO<sub>5</sub>). Les sucres et le tannin-lignine sont présents

en quantité importante dans l'effluent brut, par contre les composés azotés et le phénol n'ont pas été détectés. Compte tenu de la grande quantité de matière en suspension dans l'effluent brut celui-ci a été centrifugé à 500 rpm pendant 1 minute avant d'être traité. L'effluent que nous avons utilisé pour le traitement anaérobie contenait donc moins de solides totaux et en suspension, moins de sucres et de tannin-lignine. La DCO de cet effluent a aussi diminué tandis que la DBO<sub>5</sub> n'a pas beaucoup changé. Des acides résiniques et des acides gras insaturés sont présents dans cet effluent centrifugé.

**TABLEAU I.** Caractérisation de l'effluent PTM

Paramètres (mg/l)	Effluent	
	Brut	Centrifugé
Solides totaux	23063	5903
Solides en suspension	14090	647
Solides totaux volatils	13461	1825
Solides en suspension volatils	3728	384
pH	4,8	4,85
DCO	23301	5946
DBO <sub>5</sub>	1725	1525
Azote Kjeldahl	<10	<10
Sucres	7470	1410
Tannin-lignine	4080	1380
Acide acétique	175	170
Phénol	<10	<10
Acides résiniques	N.D.	32,0
Acides gras insaturés (C <sub>18</sub> )	N.D.	7,29

N.D.: non déterminé

### Traitement de l'effluent

Le traitement anaérobie de l'effluent a permis d'obtenir les pourcentages de réduction présentés au Tableau II. La quantité des solides totaux après une période de 28 jours d'incubation a diminué alors que les solides en suspension n'ont pas été affectés. Suite au traitement la DBO<sub>5</sub> a été réduite de façon plus importante que la DCO. La concentration des sucres a considérablement diminué tandis que la lignine et le tannin se sont montrés récalcitrants à la dégradation. La quantité des acides résiniques a baissé de façon importante et les acides gras insaturés ont complètement disparus.

**TABLEAU II.** Performance du traitement anaérobie de l'effluent PTM

Paramètres (mg/l)	Jours d'incubation		Diminution
	0	28	(%)
Solides totaux	7290	5570	24
Solides totaux volatils	2360	1910	19
Solides en suspension	629	675	0
Solides en suspension volatils	524	577	0
DCO	7039	4364	38
DBO <sub>5</sub>	2330	1075	54
Sucres	1100	340	69
Tannin-lignine	1100	1100	0
Acides résiniques	28,6	11,9	58
Acides gras insaturés	6,9	0	100

Les concentrations des acides résiniques, principales substances toxiques de l'effluent, n'ont pas toutes diminué au même degré

suite au traitement (Tableau III). Les acides abiétique et palustrique ont été les plus affectés alors que l'acide déshydroabiétique l'a été faiblement.

**TABLEAU III.** Diminution des acides résiniques suite au traitement anaérobie de l'effluent PTM

Acide résinique (mg/l)	Jours d'incubation		Diminution	
	0	28	(mg/l)	(%)
Pimarique	0,45	0,21	0,24	54
Sandaracopimarique	1,38	0,82	0,56	41
Isopimarique	3,71	1,43	2,28	61
Palustrique	5,87	1,13	4,75	81
Lévopimarique	0,82	0,21	0,61	74
Déshydroabiétique	9,19	6,73	2,46	27
Abiétique	5,52	0,91	4,61	84
Néoabiétique	1,61	0,52	1,09	68

## Discussion

### Traitabilité de l'effluent

L'effluent PTM utilisé a permis une production de gaz significativement plus importante que la culture témoin contenant de l'eau, indiquant que l'effluent contient des substances biodégradables et que le métabolisme endogène de la boue activée est faible (5). Cet effluent est considéré non toxique ou inhibiteur pour le métabolisme anaérobie car les acides gras volatils ajoutés aux milieux de culture témoin (contenant de l'eau) et contenant de

l'effluent ont été minéralisés pour donner du gaz à la même vitesse dans ces deux cultures. Basé sur la biodégradabilité et la non toxicité de l'effluent dans le traitement à l'aide de la boue activée, cet effluent provenant du filtrat du 3<sup>e</sup> stade d'épuration de la pâte thermomécanique doit être considéré traitable anaérobiquement. En utilisant des tests similaires à ceux que nous avons utilisés, Jurgensen *et al.* (2) ont déjà démontré la traitabilité de plusieurs effluents globaux provenant de différentes usines PTM ainsi que d'effluents PTM spécifiques tels que l'eau blanche et l'eau de lavage des copeaux de bois.

### Caractérisation de l'effluent

La caractérisation de l'effluent PTM utilisé a révélé que celui-ci était similaire à d'autres effluents PTM rapportés dans la littérature au point de vue de la concentration des solides en suspension (9, 10), du pourcentage que représente les sucres et la lignine combinés par rapport aux solides totaux (10, 11, 12), et de la concentration des acides résiniques et gras insaturés (13). Compte tenu que l'importance des solides en suspension est déterminée par l'efficacité de séparation des fibres à différentes étapes du procédé (1), nous avons centrifugé l'effluent avant de le traiter. Le rapport DBO/DCO de l'effluent centrifugé donne une valeur comparable à celle rapportée par Jurgensen *et al.* (2) pour plusieurs effluents PTM. En assumant que la  $DBO_5$  représente les deux tiers de la DBO totale, la valeur obtenue pour le rapport DBO/DCO suggère que l'effluent serait dégradé à environ 37%. Le pH acide et l'absence d'azote de l'effluent nous amène à suggérer, comme d'autres auteurs l'ont déjà fait avant nous, que pour obtenir un traitement anaérobie optimal il faut ajuster le pH de l'effluent et ajouter certains suppléments.

## Traitement anaérobie

Lors du traitement, seulement les substances solubles de l'effluent ont été dégradées. L'efficacité du traitement en terme de réduction de la DCO, de la DBO et des sucres a été comparable à celle obtenue par d'autres auteurs (2, 3, 4), pour le traitement anaérobie d'effluents PTM. Contrairement aux sucres, la lignine n'a pas été dégradée lors du traitement anaérobie. En fait, il est reconnu que la lignine est récalcitrante à la dégradation anaérobie compte tenu de son haut poids moléculaire et de l'inhabilité des microorganismes anaérobies à la dépolymériser (14).

À notre connaissance, il s'agit de la première démonstration que la concentration des acides résiniques de l'effluent peut être réduite de façon importante par un traitement anaérobie. La détoxification des acides résiniques a par contre été démontrée en aérobiose avec le champignon Mortierella isabellina (15). L'intérêt pour un traitement anaérobie est évident compte tenu du fait que la concentration des principales substances toxiques de l'effluent (acides résiniques) ainsi que celle des substances toxiques mineures (acides gras insaturés) sont réduites de façon importante. Des travaux sont présentement en cours afin d'augmenter l'efficacité du traitement anaérobie de l'effluent PTM.

Les auteurs remercient Louis Racine pour son excellent travail technique et le Programme de développement académique du Réseau de l'Université du Québec pour avoir soutenu financièrement le projet.

## Références

1. Wong, A.L. 1977. Pulp and paper Canada 78: 103-107.
2. Jurgensen, S.L., Benjamin, M.M., Ferguson, J.F. 1985. Tappi Proceedings, 83-92.
3. Anonyme. 1986. Report for Environment Canada Conservation and Protection Wastewater Technology Centre. Report WTC-BIO-02-88.
4. Vuoriranta, P., Rintala, J., Morange, H. 1987. Wat. Sci. Tech. 19: 1219-1221.
5. Cornacchio, L., Hall, E.R., Trevors, J.T. 1986. Technology transfer workshop on laboratory scale anaerobic treatability testing technique. Wastewater Technology Center, Environment Canada.
6. Anonyme. 1985. Standard Methods for the examination of water and wastewater.
7. Montgomery, R. 1961. Biochem. Biophys. Acta 48: 591.
8. Voss, R.H., Rapsomatiotis, A. 1985. J. Chromatogr. 346: 205-214.
9. Corson, J.A., Lloyd, J.A. 1978. Paperi ja Puu 60: 407-410, 412-413.
10. Jansson, V.M., Bjorklund, M., Back, E.L. 1975. Wood Science 8: 112-121.
11. Jansson, V.M., Bjorklund, M. 1980. Tappi 63: 78-80.
12. Järvinen, R., Vahtila, M., Manmström, B., Sundholm, J. 1980. Pulp and paper Canada 81: 39-43.
13. Leach, J.M., Thakore, A.N. 1976. Tappi 59(2): 129-132.
14. Zeikus, J.G., Wellstein, A.L., Kirk, T.K. 1982. FEMS Microbiology Letters 15: 193-197.
15. Servizi, J.A., Marten, D.W., Gordon, R.W. 1986. Water Poll. Res. J. Canada 21: 119-129.

**Développement et optimisation d'un biocapteur  
ampérométrique pour le glucose basé sur l'immobilisation  
physique de la glucose oxydase dans le polypyrrole**

**Éric Brassard**

**Daniel Bélanger**

**Guy Fortier**

**Département de chimie,  
Université du Québec à Montréal**

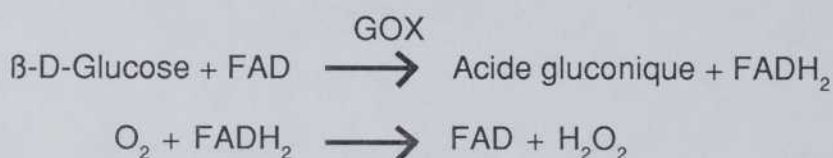
## **Introduction**

Un biocapteur est un outil analytique comprenant un élément biologique, sensible à une substance, relié intimement à un transmetteur. L'objectif est de traduire un signal biochimique en un signal électrique lequel est proportionnel à la concentration de la substance à analyser. Cet arrangement particulier combine la spécificité du système biologique (enzyme) et la sensibilité de la détection électrochimique (transmetteur).

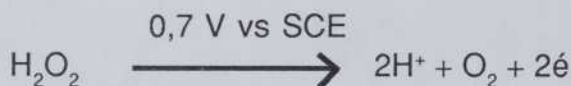
L'oxydation électrochimique du pyrrole en solution aqueuse permet la formation du polymère de polypyrrole (PP) à la surface d'une électrode (1). Le polypyrrole a été proposé comme support

d'immobilisation pour des enzymes telle la glucose oxydase (GOX) (2, 3) et l'alcool déshydrogénase (4).

La glucose oxydase catalyse l'oxydation du  $\beta$ -D-glucose en acide gluconique et en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) en utilisant l'oxygène moléculaire comme accepteur final d'électron.



Le peroxyde diffuse jusqu'à l'électrode de platine (Pt) où il est détecté par oxydation électrochimique à 0,7 volt versus une électrode de calomel saturée (SCE).



Cette étude présente les résultats de l'optimisation d'une électrode enzymatique pour le glucose préparée par l'électrodéposition du polypyrrole dans lequel l'enzyme GOX est immobilisée. L'effet de la concentration d'enzyme lors de la polymérisation et de la quantité (charge) de polypyrrole électrodéposée ont été étudiés. L'enzyme immobilisée est caractérisée par une stabilité accrue au pH et à la température. La valeur de la constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) pour la glucose oxydase immobilisée est similaire à celle déterminée pour l'enzyme soluble. Également, le biocapteur est stable pour une période supérieure à un an lorsqu'il est conservé à 4°C. Finalement, nos résultats indiquent que l'immobilisation n'affecte pas la spécificité de la GOX envers le glucose et d'autres sucres.

## Matériel

La glucose oxydase de type VII-S (E.C.# 1.1.3.4) a été obtenue de la compagnie Sigma Chemical (St-Louis, U.S.A.) et le pyrrole, d'Aldrich (St-Louis, U.S.A.). La solution de glucose (AnalaR) a été préparée dans l'eau distillée, filtrée sur  $0,45 \mu\text{m}$  et laissée à la température de la pièce pour une période de 24 heures avant usage, afin de favoriser la formation du  $\beta$ -D-glucose.

Toutes les expériences ont été effectuées avec un système à trois électrodes conventionnelles utilisant comme référence une électrode de calomel saturée. Les potentiels ont été appliqués au système avec un bipotentiotat (Pine Instruments, Inc., U.S.A.) modèle RDE4. Le courant en fonction du temps a été enregistré sur un enregistreur XYY' (Kipp & Zonen, U.S.A.) modèle BD91. L'agitation et le chauffage des solutions ont été effectués avec une plaque chauffante et agitatrice Watman modèle 430.

## Méthodes

### 1. Fabrication des électrodes

Les électrodes ont été fabriquées en fixant un disque de platine de  $0,28 \text{ cm}^2$  à la surface d'un tube de verre avec de la colle époxy. Un fil de cuivre a été soudé au disque de Pt avec de l'époxy-argent. Les électrodes ont été nettoyées par procédé électrochimique et polissage successif sur une pâte de diamant ( $1 \mu\text{m}$ ) et sur alumine aqueuse ( $0,05 \mu\text{m}$ ) (Buehler Ltd, U.S.A.).

### 2. Immobilisation de la GOX dans le PP

À 2 ml d'une solution de KCl 10 mM dégazée, ont été ajoutés 52,5  $\mu\text{l}$  de pyrrole fraîchement distillé et de 2,5 à 1250 unités (U) de GOX. Les films de PP-GOX ont été générés en mode potentiostatique à 0,65 V vs SCE. Le courant a été enregistré en fonction du

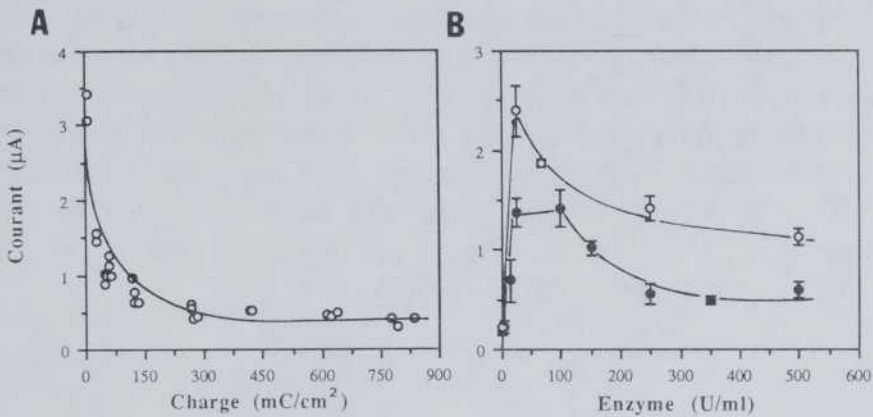
temps et une charge variant de 3,2 à 821 mC/cm<sup>2</sup> a été obtenue dans ces conditions. Les électrodes ont été lavées pendant 10 minutes dans une solution de PBS (tampon phosphate salin contenant 125 mM en NaCl, 2,7 mM en KCl et 10 mM de tampon phosphate ajustée à pH 7,5), en agitant pour enlever l'enzyme adsorbée. Les électrodes ont été conservées dans une solution PBS à 4° C.

### 3. Dosage du glucose ou d'autres sucres

Dans un volume de 5 ml de tampon phosphate à 21° C, la réponse au glucose ou aux autres sucres a été évaluée à un potentiel de 0,7 V, jusqu'à ce que l'état stationnaire soit atteint. Un aliquot d'une solution concentrée du sucre à doser a été ajouté et le courant a été enregistré à 1 minute avec agitation à 200 RPM (rotation par minute) et/ou à 2,5 minutes après son arrêt. Les électrodes ont été lavées dans une solution fraîche de PBS avant d'être réutilisées. L'effet du pH sur l'activité catalytique de la GOX immobilisée a été évalué en faisant varier le pH de 2,0 à 8,0 en utilisant un tampon glycine, acétate ou phosphate 0,1 M selon le pH. L'effet de la température sur la dénaturation de l'enzyme immobilisée ou soluble a été évalué à 50 et 60° C pendant une période de 3 heures.

## Résultats

La variation de la réponse en fonction de la charge par unité de surface du film PP-GOX a été étudiée (Fig. 1a). Des films d'épaisseurs différentes ont été obtenus en faisant varier la durée de déposition. L'augmentation de la charge provoque une diminution de la réponse du biocapteur. La figure 1b montre l'effet de la concentration d'enzyme lors du processus d'électro-polymérisation sur la réponse du biocapteur. On observe que pour des films de 50 et 411 mC/cm<sup>2</sup>, il y a une diminution de la réponse vers 100 U/ml.



**Figure 1a: Effet de la charge de PP sur la réponse de l'électrode au glucose.**

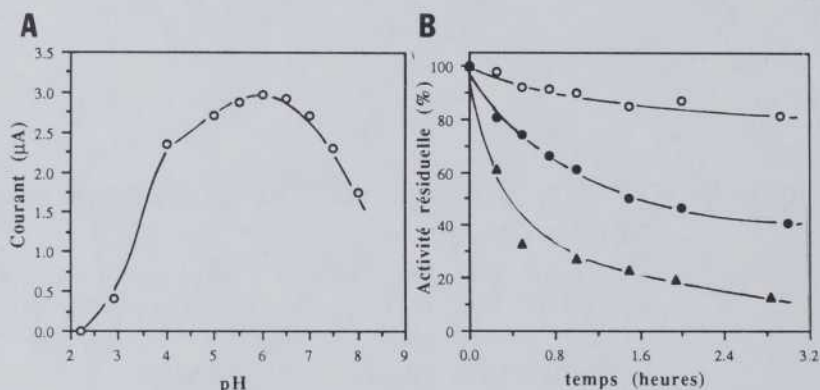
L'électrodéposition a été effectuée en présence de pyrrole 0,3 M et de 500 U/ml de GOX. Le temps de polymérisation était variable. Le dosage du glucose a été effectué à une concentration de 20 mM à pH 7,0, à 21° C, avec agitation.

**Figure 1b: Effet de la concentration de GOX (dans la solution de dépôt) sur la réponse de l'électrode au glucose.**

L'électrodéposition a été effectuée en présence du pyrrole 0,3 M et à des concentrations variables de GOX. Une charge moyenne de 411 mC/cm<sup>2</sup> (○) ou de 50 mC/cm<sup>2</sup> (●) a été déposée. Le dosage du glucose a été effectué comme précédemment.

L'effet du pH a été étudié sur un intervalle variant de 2,2 à 8,0 (Fig. 2a). Les résultats obtenus montrent que l'enzyme conserve une activité de 70% pour des pH variant de 4,0 à 7,5 et, que pour des

valeurs inférieures à 4,5 et supérieures à 7,5 l'enzyme perd une large fraction de son activité. Le pH optimal pour l'activité de l'enzyme immobilisée dans le polypyrrole est de 6,0. La figure 2b montre les cinétiques de désactivation pour l'enzyme immobilisée et soluble. On observe une diminution de 20% par rapport à l'activité initiale lorsque l'enzyme immobilisée est exposée à 50° C pendant 3 heures. Par contre, lors d'une incubation de 3 heures à 60° C, on enregistre une perte de 60% d'activité. Cependant, l'enzyme soluble perd plus de 80% de son activité après une exposition de 3 heures à 60° C.



**Figure 2a: Effet du pH sur l'activité catalytique de la GOX immobilisée.**

L'électrodéposition a été effectuée en présence de pyrrole 0,3 M, de 100 U/ml de GOX et une charge moyenne de 75 mC/cm<sup>2</sup> a été déposée. Le glucose a été dosé à une concentration de 20 mM (sans agitation) et à une température de 21° C.

**Figure 2b: Cinétiques de désactivation pour l'enzyme immobilisée et soluble.**

L'électrodéposition a été effectuée en présence de pyrrole 0,3 M, de 65 U/ml de GOX et une charge moyenne de 75 mC/cm<sup>2</sup> a été déposée. L'enzyme immobilisée a été exposée à 50 (o) et 60° C (•) et l'enzyme soluble, à 60° C (Δ) pendant un maximum de 3

heures à pH 6,0. Le glucose a été dosé à une concentration de 20 mM en absence d'agitation et à une température de 21° C.

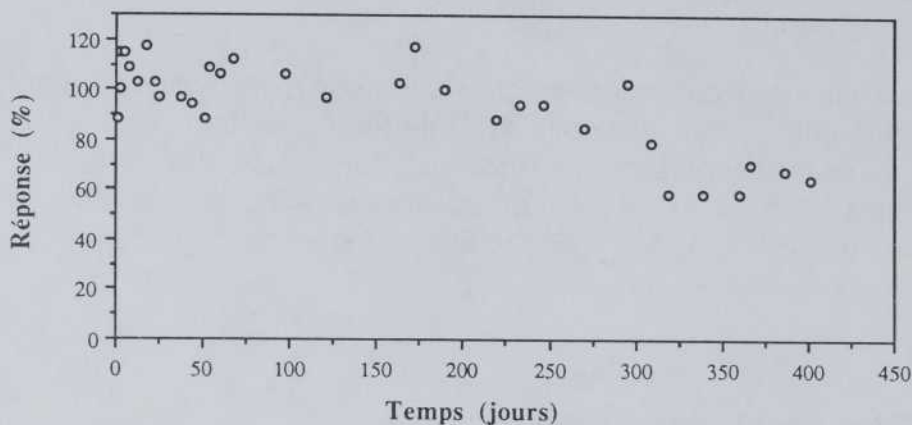
La spécificité du biocapteur pour le glucose a été évaluée envers différents sucres susceptibles d'interférer avec le glucose. Les résultats sont présentés au tableau I. Ces tests ont été effectués à pH 7,0 et à 21° C. Il est intéressant de noter qu'aucun signal n'a été observé à la sensibilité requise pour détecter le glucose pour l'ensemble des sucres testés.

**TABLEAU I.** Spécificité du biocapteur.

Sucre	concentration (mM)	Réponse du biocapteur ( $\mu$ A)
Glucose	20	0,45
Sucrose	24	n.d.
Maltose	20	n.d.
Fructose	20	n.d.
Lactose	10	n.d.

L'électrodéposition a été effectuée en présence de pyrrole 0,3 M, de 500 U/ml de GOX et une charge de 390 mC/cm<sup>2</sup> a été obtenue. Le dosage a été effectué à pH 7,0, 21°C avec agitation.

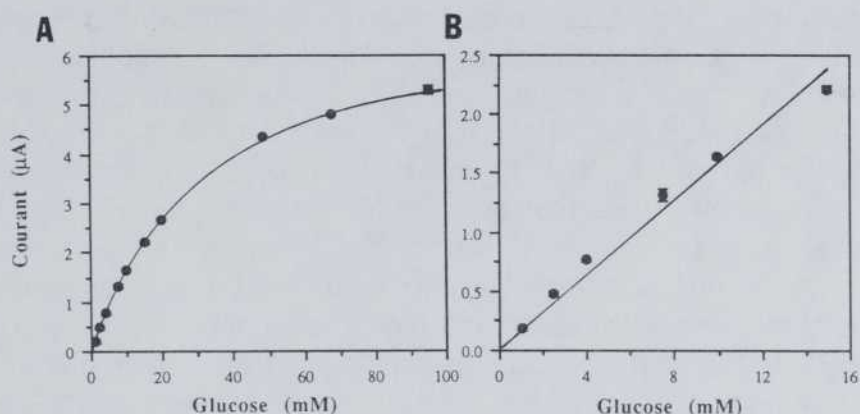
La stabilité du biocapteur à long terme est présentée à la figure suivante. L'électrode a été conservée dans un tampon PBS pH7,5 à 4°C entre chaque essai. La réponse du biocapteur a été évaluée périodiquement. La réponse est stable pour environ 100 jours. Au-delà de cette période, l'activité décroît pour atteindre 70% de la valeur initiale et est conservée ainsi pour plus de 450 jours.



**Figure 3. Stabilité à long terme du biocapteur Pt-PP-GOX.**

L'électrodéposition a été effectuée en présence de 0,3 M de pyrrole, de 500 U/ml d'enzyme et une charge de 411 mC/cm<sup>2</sup> a été déposée. Le glucose a été dosé à une concentration de 20 mM (avec agitation) à un pH de 7,0 et à température de la pièce.

La figure 4 montre une cinétique du type Michaelis-Menten, obtenue avec le biocapteur optimisé. Nous avons fait varier la concentration de glucose de 0 à 95 mM et le courant résultant a été enregistré. La réponse est linéaire entre 0 et 15 mM ( $r: 0,99$ ). Au-delà de 20 mM, il y a déviation à la linéarité.



**Figure 4a: Courbe de réponse au glucose obtenue avec le biocapteur optimisé.**

L'électrode a été préparée comme à la figure 2b. Le glucose a été dosé à pH: 7,0, à 21°C et en absence d'agitation.

**Figure 4b: Partie linéaire de la courbe de réponse au glucose obtenue avec le biocapteur optimisé.**

## Discussion

L'immobilisation de la GOX dans un film de PP a été effectuée suite à la polymérisation électrochimique du pyrrole en présence de la GOX dans une solution aqueuse de KCl, à la surface d'une électrode de platine (5). L'obtention d'une réponse ampérométrique au glucose, lorsqu'un potentiel approprié est appliqué, indique que l'enzyme est immobilisée dans le polymère. Un dosage du glucose avec une électrode de PP ne contenant pas de GOX ne génère aucune réponse. Le mécanisme résultant de l'incorporation de l'enzyme dans le PP n'est pas encore élucidé.

L'épaisseur du film de PP-GOX dépend de la charge consommée lors de sa préparation et augmente avec celle-ci (6). L'augmentation de la réponse observée en diminuant l'épaisseur du film (Fig. 1a) s'explique par des contraintes diffusionnelles du peroxyde dans le polymère. La quantité d'enzyme présente durant le processus d'électropolymérisation influence la réponse du biocapteur (Fig. 1b). En fait, de telles variations ont déjà été observées (7). Lorsqu'on est en présence de la quantité optimale de GOX, soit environ 50 U/ml pour des films de 50 et 411 mC/cm<sup>2</sup>, l'enzyme répartie dans le film permet un taux de catalyse optimal du glucose en peroxyde à l'interface Pt/polymère. À 500 U/ml de GOX, le peroxyde est plutôt produit à l'interface polymère/solution ce qui amène une diminution du signal car le peroxyde peut alors diffuser dans la solution sans être détecté à l'électrode de platine.

Le pH optimal de la GOX immobilisée est de 6,0 par rapport à 5,6 pour l'enzyme soluble (8). Un tel déplacement vers les pH plus alcalins est souvent observé lors d'immobilisation d'enzyme (9). De plus, nos résultats montrent que l'enzyme immobilisée conserve son activité catalytique sur une plus grande gamme de pH par rapport à l'enzyme soluble (8). Donc, l'immobilisation stabilise la conformation de l'enzyme et a un effet protecteur. Nos résultats montrent une augmentation de la stabilité thermique à 65°C de la GOX lorsqu'elle est immobilisée dans le PP. Les polymères peuvent augmenter la stabilité thermique des enzymes en contrôlant la nature et la structure du micro-environnement (10).

Les résultats de la stabilité à long terme du biocapteur (Fig. 3) sont intéressants. Nous constatons que la sensibilité du biocapteur diminue légèrement après une utilisation prolongée. Cette observation permet de conclure que l'intégrité du film de PP est conservée puisque l'enzyme n'est pas libérée en solution. L'immobilisation physique de la GOX dans le PP démontre une stabilité comparable à celle obtenue lors d'une immobilisation

chimique (11). De plus, nos résultats représentent une amélioration de ce paramètre, puisque Foulds et Lowe (2) ont présenté des résultats avec un biocapteur similaire, valable pour une période de 21 jours seulement.

Nous savons que l'enzyme glucose oxydase soluble est spécifique pour le  $\beta$ -D-glucose (12). Les résultats présentés au tableau I indiquent que l'immobilisation de cette enzyme dans le PP n'affecte pas sa spécificité (13).

Des résultats similaires à ceux de la figure 4a ont déjà été présentés (2) concernant un biocapteur préparé en absence de l'anion chlorure durant le processus d'électropolymérisation. Cependant, cette façon de procéder rend la préparation des électrodes beaucoup plus longue, soit 2 heures au lieu de 10 minutes comme dans notre cas. Le  $K_m$  de l'enzyme immobilisée est de 36 mM, semblable à celui de l'enzyme soluble (32 mM) (14). Ceci permet de conclure que l'affinité de la GOX n'est pas affectée par l'immobilisation. La concentration du glucose sanguin est d'environ 4 mM, cette valeur se situant dans la portion linéaire de la courbe de réponse présentée dans la figure 4b. Ceci procure l'avantage de pouvoir évaluer la concentration sanguine du glucose sans dilution préalable, ce qui est très important pour les applications in vivo.

Nous avons décrit une méthode simple et rapide d'immobilisation de la GOX dans un film de PP. Nous avons présenté les grandes lignes de la caractérisation et de l'optimisation de ce biocapteur. L'électropolymérisation a l'avantage d'être une technique d'immobilisation qui permet la miniaturisation puisqu'elle peut être effectuée sur des surfaces microscopiques. La préparation de ces électrodes nécessite un temps de polymérisation court et le coût de production est relativement faible.

**Références**

1. Asavapiriyant, S., Chandler, G.K., Gunawardena, G.A. et Pletcher, D. 1984. *J. Electroanal. Chem.* 177: 229-244.
2. Foulds, N.C. et Lowe, C.R. 1986. *J. Chem Soc. Faraday Trans. 1*: 82, 1259-1264.
3. Unama, M et Waller, J. 1986. *Anal. Chem.* 58: 2979-2983.
4. Aizawa, M., Yabaki, S., Shinohara, H. et Chiba, T. 1987. *Int. Cong. Membranes and Membranes processes, communication # 11-OB 1203*, Tokyo, Japan.
5. Fortier, G., Brassard, E. et Bélanger, D. 1988. *Biotechnol. Tech.* 3: 170-182.
6. Holdcroft, F. et Funt, B.L. 1988. *J. Electroanal. Chem.* 240: 89.
7. Bartlett, P.N. et Whitaker, R.G. 1987. *J. Electroanal Chem.* 224: 37-48.
8. Demura, M. et Asakura, T. 1989. *Biotechnol. and Bioengin.* 33: 598-603.
9. Guilbault, G.G. et Lubrano, G.L. 1973. *Anal. Chim. Acta* 64: 439-455.
10. Ye, W.N., Combes, D. et Monsan, P. 1988. *Enz. Micro. Technol.* 10: 498-502.
11. Mascini, M. et Guilbault, G.G. 1986. *Biosensors*, 2: 147-172.
12. Pazur, J.H. et Kleppe, K. 1963. *Biochemistry* 3(4): 578-583.
13. Barman, T.E. (1965) in *Enzyme Handbook*, vol. 1, Springer Verlag, New York, U.S.A., 112-113.
14. Swoboda, B.E.P. et Massey, V. 1965. *J. Biol. Chem.* 240: 2209-2222.







BNQ



000 226 947

ISBN 2-89245-103-5