



*Orlyou Recherche  
buisse de spul.ade de la  
Compagnie Générale de la France  
Laboratoire Central  
Dept Recherche "Le Graal"*

DOCUMENT



**nom**

**P.CERVANIHES - J.C. JORET**

**ETUDE DE LA DETECTABILITE  
DES PESTICIDES EN CONTINU**

**ESSAIS DE FAISABILITE DANS LE CAS DE  
L'ATRAZINE**

**SUBVENTION N° 92.195**

# SOMMAIRE



## Résumé

1 - Rappel des objectifs de l'étude

2 - Introduction

3 - Matériels et Méthodes

4 - Résultats

4.1. - Sensibilité et Précision

A - Révélation par **calorimétrie**

B - Révélation par biochimiluminescence

4.2. - Validation du dosage immunoenzymatique de l'atrazine dans les eaux

A - Immunodosage de l'atrazine dans des eaux dopées

B - Immunodosage des eaux naturellement contaminées. Corrélation entre immunoessais et CLHP

5 - Conclusion

6 - Bibliographie

## RESUME

La directive "Eau Potable" de la Commission de la Communauté Européenne a fixé en 1980 la concentration maximale autorisée (CMA) à **0,1 µg/l** pour chaque pesticide et à **0,5 µg/l** pour la totalité des pesticides présents dans un échantillon (2). Les techniques analytiques doivent donc présenter une bonne spécificité et une grande sensibilité, de préférence inférieure à la CMA. D'autre part, elles doivent être simples et peu coûteuses afin qu'un grand nombre d'échantillons puisse être traité et que le diagnostic d'une contamination puisse être validé par des méthodes statistiques. Enfin le délai de réponse d'une analyse doit être court pour permettre une intervention rapide en cas de pollution.

Les méthodes classiques que sont la CLHP (Chromatographie Liquide Haute Performance), la CPG (Chromatographie Phase Gazeuse) et la CG-SM (Chromatographie Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse) assurent une grande sensibilité et une grande spécificité aux dosages mais sont inadaptées pour l'analyse rapide et peu coûteuse d'un grand nombre d'échantillons; chaque analyse nécessite en effet une phase de préparation assez longue (extraction, purification et parfois dérivatisation), et la haute technologie des appareils mis en oeuvre rend l'opération onéreuse.

Les immunodosages, récemment pris en considération pour leur application au contrôle de l'environnement (années 80), offrent une grande simplicité tant dans le dosage lui-même que dans l'appareillage qu'ils mettent en oeuvre. Leur sensibilité permet d'éliminer les étapes d'extraction et de concentration, ce qui réduit significativement le temps d'analyse et le volume d'échantillon à analyser.

Cette étude visait à déterminer la faisabilité de l'automatisation des immunoessais, notamment dans la détection de l'atrazine.

Il était nécessaire, de déterminer précisément la qualité de tests immunoenzymatiques (kits) disponibles sur le marché. Sachant que la spécificité, la précision et la limite de détection de ces réactions sont principalement fonction de la qualité des anticorps.

Les résultats obtenus auparavant (phase 1 et 2 de ce même programme) montrent que les kits de détection d'atrazine de première génération (Immunosystem) sont peu précis (1).

En effet, par rapport à la technique de référence CLHP, l'immunoessais donne :

des disparités importantes pour les échantillons qui contiennent entre 50 et 100 **ng/l** d'atrazine.

une sur-estimation de la concentration d'atrazine des échantillons contenant 500 à 1000 **ng/l**.

des résultats similaires avec des échantillons qui contiennent entre 1000 et 2000 **ng/l**

une sous-estimation de la concentration pour les échantillons ayant 2000 à 4000 **ng/l** d'atrazine

un bon coefficient de corrélation ( $r = 0.9$ ), avec néanmoins une **dispersion** des valeurs très importantes.

En conséquence, les kits de première génération (Immunosystem) sont insuffisamment sensibles et précis et ne peuvent en aucun cas être utilisés comme test de dosage quantitatif de l'atrazine et encore moins pour un système d'alerte.

Une deuxième génération de lots (**Riedel** de Haën) semblait posséder les caractéristiques nécessaires à la conception d'un automate d'alerte.

Il était donc particulièrement intéressant de tester ces kits.

D'après nos résultats ces kits ont un seuil de détection reproductible et fiable de 25 **ng/l** par révélation **colorimétrique** et de 10 **ng/l** par révélation BCL (coefficient de variation de 6%). La variation de l'erreur de mesure est plus importante lorsqu'on travaille avec des eaux naturelles (30%).

L'analyse des eaux naturellement contaminées par la méthode classique CLHP et par immunoessais a montré qu'il existe une très bonne corrélation entre ces 2 techniques et ceci indépendamment du type de révélation utilisé (**colorimétrie** ou BCL).

L'immunodosage révélé par biochimiluminescence **offre** en outre l'avantage de réduire de 30 minutes le temps de manipulation.

Les résultats obtenus au cours de cette étude sur les lots de deuxième génération, nous permettent de conclure qu'ils répondent aux besoins analytiques nécessaires au développement d'un automate en ligne, de détection d'atrazine dans les eaux de rivière et les eaux en sortie d'usine.

**ESSAIS DE FAISABILITE DANS LE CAS DE L'ATRAZINE**

**1 - RAPPEL DES OBJECTIFS DE L'ETUDE**

Dans le cadre du développement d'un automate de détection des pesticides en continu, seules les méthodes immunoenzymatiques répondent aux besoins de simplicité et rapidité d'exécution.

Cette étude visait à déterminer la faisabilité de l'automatisation des immunoessais, notamment dans la détection de l'atrazine.

Il était nécessaire, de déterminer précisément la qualité de tests immunoenzymatiques (kits) disponibles sur le marché. Sachant que la spécificité, la précision et la limite de détection de ces réactions sont principalement fonction de la qualité des anticorps.

Les résultats obtenus auparavant (phase 1 et 2 de ce même programme) montrent que les kits de détection d'atrazine de première génération (Immunosystem) sont peu précis (1).

En effet, par rapport à la technique de référence CLHP, l'immunoessais donne :

- des disparités importantes pour les échantillons qui contiennent entre 50 et 100 ng/l d'atrazine.
- une sur-estimation de la concentration d'atrazine des échantillons contenant 500 à 1000 ng/l.
- des résultats similaires avec des échantillons qui contiennent entre 1000 et 2000 ng/l
- une sous-estimation de la concentration pour les échantillons ayant 2000 à 4000 ng/l d'atrazine
- un bon coefficient de corrélation ( $r = 0.9$ ), avec néanmoins une dispersion des valeurs très importantes.

En conséquence, les kits de première génération (Immunosystem) sont insuffisamment sensibles et précis et ne peuvent en aucun cas être utilisés comme test de dosage quantitatif de l'atrazine et encore moins pour un système d'alerte.

Une deuxième génération de kits (Riedel de Haën) semblait posséder les caractéristiques nécessaires à la conception d'un automate d'alerte. En effet, ces concepteurs annoncent que :

- les anticorps anti-atrazine de ces kits ont un faible pourcentage de réactions croisées avec d'autres molécules de la famille triazine, ce qui implique une plus grande spécificité pour l'atrazine (11).
- le seuil de sensibilité est de 10 ng/l. (11).

Ainsi, la dernière phase de cette étude est consacrée à l'étude des kits de deuxième génération (**Riedel** de Haen) :

- sensibilité et précision
- erreur de la mesure d'après le dopage des eaux
- corrélation avec le CLHP
- révélation par biochimiluminescence
- standardisation des étapes du protocole au vue de son automatisation.

## **2 - INTRODUCTION**

L'atrazine est un pesticide de la famille des triazines. Ces derniers sont des herbicides antidicotylédones et **antigraminées**, principalement utilisés pour les cultures de maïs et de pommiers.

Ce pesticide s'accumule dans les nappes phréatiques, et sa **rémanence** est d'environ 6 mois.

De plus, l'atrazine est stable dans l'eau et lors des périodes de pluie sa teneur augmente considérablement dans les eaux de rivière.

L'atrazine, molécule de synthèse organique peut nuire à la santé humaine et animale. Il est donc important de réduire la concentration d'atrazine dans les eaux de consommation. Un traitement ozone/péroxyde d'oxygène est nécessaire lors de la potabilisation des eaux fortement contaminées,.

La directive "Eau Potable" de la Commission de la Communauté Européenne a fixé en 1980 la concentration maximale autorisée (CMA) à **0,1 pg/l** pour chaque pesticide et à **0,5 pg/l** pour la totalité des pesticides présents dans un échantillon (2). Les techniques analytiques doivent donc présenter une bonne spécificité et une grande sensibilité, de préférence inférieure à la CMA. D'autre part, elles doivent être simples et peu coûteuses afin qu'un grand nombre d'échantillons puisse être traité et que le diagnostic d'une contamination puisse être validé par des méthodes statistiques. **Enfin** le délai de réponse d'une analyse doit être court pour permettre une intervention rapide en cas de pollution.

Les méthodes classiques que sont la CLHP (Chromatographie Liquide Haute Performance), la CPG (Chromatographie Phase Gazeuse) et la CG-SM (Chromatographie Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse) assurent une grande sensibilité et une grande spécificité aux dosages mais sont inadaptées pour l'analyse rapide et peu coûteuse d'un grand nombre d'échantillons; chaque analyse nécessite en effet une phase de préparation assez longue (extraction, purification et parfois dérivatisation), et la haute technologie des appareils mis en oeuvre rend l'opération onéreuse.

Les immunodosages, récemment pris en considération pour leur application au contrôle de l'environnement (années **80**), offrent une grande simplicité tant dans le dosage lui-même que dans l'appareillage qu'ils mettent en oeuvre. Leur sensibilité permet d'éliminer les étapes d'extraction et de concentration, ce qui réduit significativement le temps d'analyse et le volume d'échantillon à analyser.

Les immunodosages sont basés sur une reconnaissance spécifique entre un antigène et un anticorps.

Un antigène (Ag) est une molécule de poids moléculaire supérieur à 5000 **daltons**, souvent **de** nature protéinique. Il est capable d'induire une réponse immunitaire (propriété immunogène de l'antigène) chez un organisme animal infecté. Cette réponse se traduit par la production et la circulation dans cet organisme d'immunoglobulines sériques, les anticorps (Ac) polyclonaux, qui reconnaissent les antigènes et s'y lient spécifiquement (propriété d'antigénicité de l'antigène) sur des sites particuliers appelés **épitopes** ou déterminants antigéniques.

Un haptène, l'atrazine par exemple, est une molécule qui possède un caractère antigénique mais ne peut induire seul une réponse immunitaire. Pour qu'un haptène acquiert un pouvoir immunogène, il doit être lié à une protéine dite protéine "porteuse". La liaison ne doit pas altérer les parties actives (épitopes) de l'haptène celle-ci est assurée par une molécule "pont" ou "**spacer**" comme l'héxaméthylènetétramine, les carbodiimides ou les diisocyanates dont la taille peut être allongée par des esters succinimidiques ou d'anhydrides mixtes après alkylation.

Comme la formation du complexe Ag-Ac se fait aussi bien in vivo qu'in vitro, on a pu mettre à profit ce phénomène dans la mise au point de dosages permettant la détermination quantitative, directe ou indirecte, de la concentration en complexes formés.

De nombreux laboratoires ont développé des techniques variées d'immuno-détection comme la séroneutralisation, la précipitation, l'agglutination, la fixation du complément. Ces techniques de sensibilité moyenne (seuil de détection  $10^{-3}$  à  $10^{-7}$  g) ont souvent été utilisées pour le dosage qualitatif et quantitatif d'anticorps par rapport à un antigène de référence pour contrôler le système immunitaire d'organismes malades.

Pour doser des antigènes à des concentrations inférieures ou égales à  $10^{-9}$  g, il a fallu concevoir d'autres systèmes de détection des complexes Ag-Ac. En faisant appel à des techniques de marquage des anticorps ou des antigènes dès les années 60, la sensibilité des immunodosages a été largement améliorée.

Un marqueur est un élément ou une molécule capable de se lier à un Ac ou **un** Ag sans en altérer les propriétés immunologiques, et qui permet de révéler, par son activité, la présence des complexes Ag-Ac formés au cours du dosage.

Les méthodes immunochimiques utilisant des marqueurs reposent sur un principe d'analyse par compétition ou non, en phase homogène ou hétérogène.

Les analyses en phase hétérogène nécessitent une étape de séparation entre la fraction liée (complexe Ag-Ac-marqué) et la fraction libre du composé marqué (conjugué). Le moyen le plus simple et le plus couramment utilisé pour effectuer cette séparation consiste à adsorber les Ac ou les Ag sur un support solide de manière à pouvoir éliminer par simple lavage la fraction **libre**.

Les supports généralement en polystyrène ou en chlorure de polyvinyle sont le plus souvent des tubes ou des micropuits.

En revanche, les dosages en phase homogène **s'affranchissent** de l'étape de séparation et se déroulent entièrement en phase liquide.

Les dosages en phase hétérogène sont généralement des méthodes basées sur le principe d'une réaction compétitive dont on fixe soit un antigène (Figure 1a), **soit un** anticorps (Figure 1b) en quantité définie sur le support.