



HAL
open science

Biodégradation de composés organophosphores à liaison P-S (VX, tetriso et demeton-S-methyl)

Didier Hilaire

► **To cite this version:**

Didier Hilaire. Biodégradation de composés organophosphores à liaison P-S (VX, tetriso et demeton-S-methyl). Médecine humaine et pathologie. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2001. Français. NNT : 2001NAN12008 . tel-01748675

HAL Id: tel-01748675

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748675v1>

Submitted on 29 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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

UNIVERSITE HENRI POINCARE – NANCY 1

2001

ECOLE DOCTORALE « BIOLOGIE SANTE ENVIRONNEMENT »

THESE

Présentée et soutenue publiquement

Le : 27 Février 2001

Pour obtenir le titre de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE
HENRI POINCARE – NANCY 1**

Mention Chimie et Microbiologie de l'eau



Par **Didier HILAIRE**

Titulaire du Diplôme d'Etudes Approfondies Chimie Microbiologie de l'Eau

Sujet :

**BIODEGRADATION DE COMPOSES ORGANOPHOSPHORES A LIAISON P-S
(VX, TETRISO ET DEMETON-S-METHYL)**

MEMBRES DU JURY

Rapporteurs : J. LE PETIT (Professeur, Université Aix-Marseille)
T.M. VOGEL (Professeur, Université Lyon 1)

Juges : J.C. BLOCK (Professeur, Université Henri Poincaré – Nancy 1)
R. BONALY (Professeur, Université Henri Poincaré – Nancy 1)
M. DESGRANGES (Docteur, responsable de la division Production du Centre
d'Etudes du Bouchet)
F. JORAND (Maître de Conférence, Université Henri Poincaré – Nancy 1)

FACULTE DE PHARMACIE

UNIVERSITE Henri Poincaré - NANCY I

Membres du personnel enseignant

Doyen : Mme Chantal FINANCE

Vice Doyen : Mme Anne ROVEL

DOYENS HONORAIRES

M. BERNANOSE André
M. VIGNERON Claude



PROFESSEURS HONORAIRES

Mlle BESSON Suzanne
Mlle GIRARD Thérèse
M. LECTARD Pierre

M. MIRJOLET Marcel
M. PIERFITTE Maurice

PROFESSEUR EMERITE

M. LOPPINET Vincent

PROFESSEURS

M.	ASTIER Alain	Pharmacie Clinique
M.	ATKINSON Jeffrey	Pharmacologie
M.	BAGREL Alain	Biochimie fondamentale et clinique, Biotechnologies
Mlle	BATT Anne Marie	Toxicologie
M.	BLOCK Jean Claude	Santé et Environnement
M.	BONALY Roger	Biochimie microbienne
Mme	CAPDEVILLE-ATKINSON	Pharmacologie Cardiovasculaire
Mme	FINANCE Chantal	Microbiologie moléculaire
Mme	FRIANT-MICHEL Pascale	Biomathématiques, Biophysique et Audioprothèse
Mlle	GALTEAU Marie Madeleine	Biochimie
M.	HENRY Max	Biologie végétale
M.	HOFFMAN Maurice	Pharmacie clinique
M.	JACQUE Michel	Pharmacodynamie
M.	LABRUDE Pierre	Physiologie
M.	LALLOZ Lucien	Chimie organique
M.	LEROY Pierre	Physico-chimie appliquée à la formulation pharmaceutique
M.	MAINCENT Philippe	Pharmacie galénique
M.	MARSURA Alain	Chimie thérapeutique
M.	MARTIN Jean Armand	Chimie minérale et Minéralogie
M.	MORTIER François	Pharmacognosie
M.	NICOLAS Alain	Chimie analytique et Bromatologie
M.	REGNOUF DE VAINS Jean Bernard	Chimie Thérapeutique
Mme	SCHWARTZBROD Janine	Bactériologie - Parasitologie
M.	SCHWARTZBROD Louis	Virologie - Immunologie
M.	SIEST Gérard	Chimie Biologique
M.	SIMON Jean Michel	Droit et Economie de la Santé
M.	VIGNERON Claude	Hématologie

MAITRES DE CONFERENCES

Mme	ALBERT Monique	Bactériologie - Virologie
M.	BONNEAUX François	Chimie Thérapeutique
M.	CATAU Gérald	Pharmacodynamie
M.	CHEVIN Jean Claude	Chimie minérale
M.	CHILLON Jean Marc	Pharmacologie
M.	COLLIN Jean François	Pôle européen
Mme	COLLOMB Jocelyne	Parasitologie
M.	COULON Joël	Biochimie
M.	DECOLIN Dominique	Chimie analytique
M.	DUCOURNEAU Joël	Biophysique, Audioprothèse, Acoustique
Mme	FAIVRE-FIORINA Béatrice	GBM - Hématologie
M.	FERRARI Luc	Biochimie
Mle	FONS Françoise	Biologie Végétale et Mycologie
Mme	FUZELLIER Marie Claude	Pharmacognosie
M.	GANTZER Christophe	Virologie
M.	GIBAUD Stéphane	Pharmacie Clinique
Mme	HASENFRATZ-SAUDER Marie Paule	Biologie Végétale
Mle	HINZELIN Françoise	Biologie végétale et Pharmacognosie
M.	HUMBERT Thierry	Interactions moléculaires
Mle	IMBS Marie Andrée	Bactériologie - Virologie et Parasitologie
M.	JORAND Frédéric	Santé et Environnement
Mme	KEDZIEREWICZ Francine	Pharmacie Galénique
Mme	LARTAUD-IDJOUADIENE Isabelle	Pharmacologie
Mme	LEININGER-MULLER Brigitte	Biochimie
Mme	LETOT Michèle	Bactériologie - Virologie et Parasitologie
Mme	LIVERTOUX Marie Hélène	Toxicologie
Mme	MARCHAL-HEUSSLER Emmanuelle	Chimie Analytique
Mme	MARCHAND-ARVIER Monique	Immunologie - Hématologie
M.	MENU Patrick	Physiologie
M.	MONAL Jean Louis	Chimie Thérapeutique
M.	NOTTER Dominique	Biologie cellulaire
Mme	PAULUS Francine	Informatique
Mme	PERDICAKIS Christine	Chimie organique
Mme	PICHON Virginie	Biophysique
Mme	POCHON Marie France	Chimie analytique
Mme	ROVEL Anne	Immunologie - Hématologie
M.	VISVIKIS Athanase	Toxicologie
Mme	WELLMAN-ROUSSEAU Maria Monika	Biochimie
Mme	ZINUTTI Colette	Pharmacie galénique

ASSISTANTS

Mme	BEAUD Mariette	Biologie Cellulaire
Mme	BERTHE Marie-Catherine	Biochimie
M.	DANGIEN Bernard	Botanique
Mme	MOREAU Blandine	Pharmacognosie
Mme	PAVIS Annie	Parasitologie
M.	TROCKLE Gabriel	Pharmacodynamie

PROFESSEUR ASSOCIE

Mme	GRISON Geneviève	Pratiques officinales
-----	------------------	-----------------------

PROFESSEUR AGREGE

M.	COCHAUD Christophe	Anglais
----	--------------------	---------

Remerciements

Quand le travail de thèse s'achève et que l'heure des bilans arrive, des pensées particulières s'adressent à tous ceux qui ont aidé de près ou de loin à la construction de cet édifice qu'est une thèse.

Mes plus vifs remerciements à Henri Guarrigue et Jean-Claude Block qui, comme les enzymes, ont joué le rôle de catalyseur de ce travail.

Que Messieurs Bonaly, Desgranges, Jorand, Le Petit et Vogel, qui ont accepté de juger ce travail, acceptent mes remerciements les plus respectueux.

Que ma hiérarchie, en particulier Gérard Trouiller, soit remerciée pour m'avoir permis d'effectuer cette thèse dans le cadre de mon activité professionnelle au Centre d'Etudes du Bouchet.

Que tous les personnels du contingent et stagiaires qui ont œuvré à l'achèvement de ce travail reçoivent ma reconnaissance et gratitude. Leur aide a été quotidienne, pas toujours gratifiante mais indispensable à la réussite.

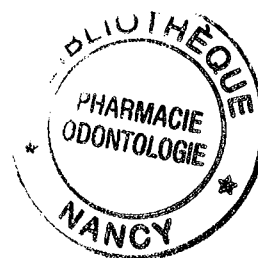
Que mes collègues du LCPE, INSA et PG31 qui ont suivi l'avancée de ce travail reçoivent une pensée amicale et mes remerciements.

Que les membres (trop nombreux pour être cités ici) des équipes des laboratoires de RMN et de décontamination chimique du CEB agrément ma gratitude pour leur aide et conseils.

Ma plus profonde reconnaissance à Lysianne pour sa contribution inestimable et quotidienne à ce travail.

GLOSSAIRE

BTS : Bouillon trypticase soja
CBW : Chemical, biological weapons
CEB : Centre d'Etudes du Bouchet
Ci : Concentration initiale
CPG : Chromatographie phase gazeuse
COP : Composé organophosphoré
DPAT : Diisopropylaminoéthanthiol
DTNB : Acide 5.5 dithio bis 2-nitrobenzoïque
EA2192 : acide S-diisopropylaminoéthylméthylphosphonique
EMPA : acide éthyl méthylphosphonique
kcat : Constante catalytique
km : Constante de michaelis
MPA : acide méthylphosphonique
NPD : Détecteur azote phosphore
OPAA : Organophosphorus anhydrase acide
OPH : Organophosphate hydrolysing enzyme
OTAN : Organisation du traité de l'Atlantique nord
PBS : Phosphate buffer salt
PG31 : Project group 31
RMN : Résonance magnétique nucléaire
RVX : Russian VX
SDCM : Solution de décontamination chimique des matériels
TNB : 5'-thiol-nitrobenzoate
Vi : Vitesse initiale
Vm : Vitesse maximale
Voie I.P. : Voie intra péritonéale
Voie I.V. : Voie intra veineuse



SOMMAIRE

Introduction	1
Chapitre 1 – Revue Bibliographique	4
1-1 Présentation des composés organophosphorés.....	4
1-1-1 Introduction.....	4
1-1-2 Historique.....	5
1-1-3 Les composés organophosphorés pesticides.....	5
1-1-4 Toxicité des composés organophosphorés pesticides.....	6
1-2 Les armes chimiques.....	9
1-2-1 Introduction.....	9
1-2-2 Décontamination.....	12
1-3 Le VX.....	13
1-3-1 Caractéristiques physico-chimiques.....	13
1-3-2 Dégradation chimique.....	13
1-3-3 Dosage du VX.....	16
1-4 Dégradation des composés organophosphorés.....	17
1-4-1 Introduction.....	17
1-4-2 Dégradation des composés organophosphorés dans l’environnement.....	17
1-4-3 Biodégradation des composés organophosphorés.....	19
1-5 Conclusions.....	29
Chapitre 2 – Stabilité du VX, du déméton-S-méthyl et du tétriso en milieu abiotique ... 30	
2-1 Introduction.....	30
2-2 Matériels et méthodes.....	32
2-2-1 Composés organophosphorés.....	32
2-2-2 Milieux d’essai.....	33
2-2-3 Dosage des composés organophosphorés à liaison P-S.....	34
2-2-4 Analyse RMN.....	38
2-3 Résultats expérimentaux.....	38
2-3-1 Comparaison de la stabilité chimique du VX dans les milieux BTS, Niven, minéral nutritif tamponné, Czapek et tampon tris/HCl 20 mM.....	38
2-3-2 Recherche de l’influence des constituants de taille inférieure à 1 kD des milieux Niven et BTS sur la stabilité chimique du VX.....	39
2-3-3 Effet de l’extrait de levure, sucres et tampon phosphate sur le devenir du VX en conditions abiotiques.....	41
2-3-4 Recherche des produits de dégradation abiotique du VX en milieu minéral nutritif... 42	
2-3-5 Effets de la nature du phosphate sur le devenir du VX en conditions abiotiques.....	42

2-3-6	Comparaison de la stabilité chimique du VX, du déméton-S-méthyl et du tétriso en milieux BTS, minéral nutritif et tampon phosphate 20 g.L ⁻¹	46
2-4	Discussion.....	48
2-4-1	Dégradation abiotique du VX.....	48
2-4-2	Comparaison de la stabilité abiotique du VX, du déméton-S-méthyl et du tétriso.....	49
2-5	Conclusions.....	51

Chapitre 3 – Etude du comportement du VX, déméton-S-méthyl et du tétriso en présence de micro-organismes en culture pure..... 52

3-1	Introduction.....	52
3-2	Matériels et méthodes.....	54
3-2-1	Composés organophosphorés.....	54
3-2-2	Micro-organismes d’essai et milieux d’essai.....	54
3-2-3	Essais en erlen.....	55
3-2-4	Essais en réacteurs.....	56
3-2-5	³¹ P RMN.....	57
3-3	Résultats expérimentaux.....	57
3-3-1	Comparaison de la stabilité du VX en présence de micro-organismes en culture pure.....	57
3-3-2	Effet de l’extrait de levure et des peptones sur la dégradation biologique du VX par <i>Corynebacterium glutamicum</i>	62
3-3-3	Effet du sucre sur la dégradation biologique du VX par <i>Corynebacterium glutamicum</i>	64
3-3-4	Effet du taux de croissance et de la biomasse sur la dégradation biologique du VX par <i>Corynebacterium glutamicum</i>	66
3-3-5	Effet de la concentration en tampon phosphate sur la dégradation biologique du VX par <i>Corynebacterium glutamicum</i>	67
3-3-6	Recherche de la capacité de <i>Corynebacterium glutamicum</i> à dégrader biologiquement le déméton-S-méthyl et le tétriso.....	70
3-3-7	Détermination de l’effet de l’extrait de levure, du tampon phosphate et des sucres sur la dégradation biologique du déméton-S-méthyl par <i>Corynebacterium glutamicum</i> ...70	
3-3-8	Recherche des produits de dégradation biologique du VX et du déméton-S-méthyl...73	
3-3-9	Dégradation biologique du DPAT par <i>Corynebacterium glutamicum</i>	74
3-3-10	Dégradation biologique du VX et du déméton-S-méthyl par <i>Corynebacterium petrophilum</i>	77
3-4	Discussion.....	81
3-4-1	Biodégradabilité du VX.....	81
3-4-2	Dégradation du VX par <i>Corynebacterium glutamicum</i> et <i>Corynebacterium petrophilum</i>	82
3-4-3	Dégradation biologique du déméton-S-méthyl par <i>Corynebacterium glutamicum</i> et <i>Corynebacterium petrophilum</i> , comparaison avec le VX.....	85
3-5	Conclusions.....	86

Chapitre 4 – Détermination de la capacité d'extraits exo et intracellulaires à dégrader biologiquement le VX, le déméton-S-méthyl et le tétriso..... 87

4-1 Introduction..... 87

4-2 Matériels et méthodes..... 89

4-2-1 Matériel chimique..... 89

4-2-2 Matériel biologique..... 89

4-2-3 Préparation des extraits cellulaires..... 89

4-2-4 Détermination de la dégradation biologique du VX, du déméton-S-méthyl et du tétriso par les extraits cellulaires..... 91

4-2-5 Témoins abiotiques..... 92

4-3 Résultats expérimentaux..... 93

4-3-1 Comparaison de la capacité à dégrader le VX des extraits provenant de *Alternaria tenuis*, *Bacillus sphaericus*, *Corynebacterium glutamicum* et *Rhodococcus opaccus*..... 93

4-3-2 Effet de la concentration du tampon phosphate et de la méthode de lyse sur la dégradation biologique du VX par des extraits intra-cellulaires de *Corynebacterium glutamicum*..... 95

4-3-3 Comparaison de la capacité des extraits intra cellulaires de *Corynebacterium glutamicum* à dégrader biologiquement le VX et le déméton-S-méthyl..... 96

4-4 Discussions..... 98

4-4-1 Comparaison de la capacité des extraits cellulaires à dégrader le VX..... 98

4-4-2 Localisation des systèmes enzymatiques capables de dégrader le VX, le tétriso et le déméton-S-méthyl..... 99

4-4-3 Comparaison de la dégradation biologique du VX, du tétriso et du déméton-S-méthyl par l'extrait intra cellulaire de *Corynebacterium glutamicum*..... 100

4-5 Conclusions..... 100

Chapitre 5 – Purification d'une enzyme capable d'hydrolyser le VX..... 101

5-1 Introduction..... 101

5-2 Matériels et méthodes..... 102

5-2-1 Matériel chimique..... 102

5-2-2 Matériel biologique..... 102

5-2-3 Préparation des extraits protéiques..... 103

5-2-4 Dosage protéique..... 103

5-2-5 Détermination de l'activité catalytique des extraits protéiques vis à vis des composés organophosphorés..... 104

5-2-6 Témoins abiotiques..... 104

5-2-7 Electrophorèse..... 104

5-2-8 Purification de la dipeptidase..... 105

5-2-9 Purification de la VXase..... 106

5-3 Résultats expérimentaux..... 107

5-3-1 Purification de la dipeptidase.....	107
5-3-2 Détermination de la capacité de la dipeptidase à hydrolyser le VX.....	108
5-3-3 Purification de la VXase.....	109
5-3-4 Etude des constantes enzymatiques de la VXase.....	111
5-3-5 Détermination de la pureté et du poids moléculaire de la VXase.....	114
5-3-6 Recherche de la capacité de la VXase à hydrolyser le paraoxon.....	116
5-4 Discussions.....	116
5-5 Conclusions.....	121
6- Conclusions et perspectives.....	122
7- Références bibliographiques.....	125

INTRODUCTION

Le conflit Irak-Iran, la guerre du golfe (1990-1991) et les différents attentats perpétrés par la secte Aoun au Japon (1994-1995) ont montré que l'utilisation d'armes chimiques, malgré leur prohibition (convention d'interdiction des armes chimiques de 1993), est un risque non négligeable qui s'étend non seulement au champ de bataille mais également aux populations civiles. Une des préoccupations des états-majors militaires et de la sécurité civile est la décontamination des blessés, des matériels et des équipements contaminés. Les solutions décontaminantes utilisées actuellement sont en effet très efficaces mais de par leur caractère alcalin elles sont extrêmement agressives à l'égard de nombreux supports (peau, peintures, aluminium, polymères, composants électroniques...). Leur emploi reste limité. La mise au point de solutions décontaminantes alternatives utilisables à un pH proche de la neutralité est un objectif que différents pays se sont donnés. Parmi ces modes de décontamination palliatifs, la voie biologique ou enzymatique (Trapp, 1985) présente des intérêts non négligeables aux niveaux opérationnels et environnementaux; à savoir :

- solution utilisable avec les équipements de décontamination actuels,
- procédé ne nécessitant pas de rinçage après application,
- simplicité d'utilisation (remise en suspension dans l'eau d'enzymes lyophilisées),
- enzymes conservées sous forme lyophilisée ne demandant pas de stockage spécifique,
- absence de toxicité,
- respect de l'intégrité des matériaux à décontaminer,
- respect de l'environnement.

Cette méthode a été l'une de celle retenue par la France, qui dans le cadre du projet OTAN PG31 "Non-corrosive, Biotechnology-based decontaminants for CBW agents" s'est associée à différents pays (Etats-Unis, Allemagne, Grande-Bretagne, Italie et Turquie) pour la mise en œuvre d'une solution décontaminante constituée d'enzymes capables de dégrader les principaux agents de guerre chimiques (ypérites, agents G et VX). Conjointement à ce besoin de solutions décontaminantes non agressives, la mise en place de la convention d'interdiction des armes chimiques entrée en vigueur le 29 avril 1997 interdit aux pays signataires de fabriquer, acquérir, transférer et d'utiliser des armes chimiques mais la convention impose

surtout la destruction des stocks existants (Mulbry et Rainina, 1998). Jusqu'alors la convention de Genève de 1925 interdisait l'emploi des armes chimiques mais permettait leur fabrication et leur détention. Pour certains états, la destruction des stocks est une problématique à la fois industrielle, économique et écologique. L'armée américaine a estimé que la destruction de ses stocks représentait un marché de l'ordre de 17 milliards de dollars (Mulbry et Rainina, 1998). Dans ce cadre de la destruction des stocks, l'utilisation de procédés biologiques pourrait proposer une stratégie alternative économiquement et environnementalement acceptable (Mulbry et Rainina, 1998).

Le travail présenté ici s'inscrit donc dans le cadre du projet OTAN PG31. Son objectif est d'isoler une enzyme d'origine microbienne capable d'hydrolyser la liaison P-S du méthylthiophosphonate de O-éthyle S-2 diisopropylamino éthyle (VX), un des composés organophosphorés (COP) à usage militaire parmi les plus toxiques et les plus récalcitrants à la biodégradation (Defrank, 1991). Pour cela cinq étapes de travail ont été développées.

La première étape est consacrée à une revue bibliographique portant sur la présentation des COP et leur stabilité chimique et biologique.

La seconde étape porte sur la stabilité chimique du VX, comparée respectivement à celle du déméton S-méthyl et du tétriso, deux composés organophosphorés à liaison P-S beaucoup moins toxiques que le VX. Cette comparaison a pour objet de définir si le déméton-S-méthyl ou le tétriso peuvent être utilisés comme modèle du VX lors des expérimentations. Ce chapitre a aussi pour but d'identifier les paramètres physico-chimiques influençant la dégradation abiotique du VX.

La troisième partie est dédiée aux essais biologiques effectués avec 7 micro-organismes en culture pure pour identifier la souche la plus performante à dégrader biologiquement le VX. Parmi ces 7 souches, 3 se sont révélées capables de dégrader le VX : *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium petrophilum* et *Alternaria tenuis*. La souche *Corynebacterium glutamicum* est apparue la plus performante. Les effets de l'extrait de levure, des peptones, des sucres et du tampon phosphate sur la dégradation biologique du VX par cette souche ont été déterminés. Sa capacité à dégrader le déméton-S-méthyl et le tétriso a été recherchée et

comparée au VX . Enfin les sites d'attaque du VX et du déméton-S-méthyl par cette bactérie ont été identifiés.

La quatrième étape a pour objet la comparaison de la capacité d'extraits exo et intracellulaires de quatre souches (*Corynebacterium glutamicum*, *Alternaria tenuis*, *Rhodococcus opacus* et *Bacillus sphaericus*) à dégrader le VX. Cette comparaison met en évidence la présence d'une activité d'hydrolase du VX (rupture de la liaison P-S) de l'extrait intracellulaire de *Corynebacterium glutamicum* .

La cinquième étape est consacrée à la purification de la dipeptidase de *Lactobacillus sake* et de la VXase de *Corynebacterium glutamicum* ainsi qu'à l'étude de leur capacité à dégrader le VX.

La conclusion de ce travail porte sur une synthèse des résultats et dégage les perspectives pour la suite à donner.

CHAPITRE 1 - REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

L'analyse bibliographique s'articule en 4 parties : présentation des composés organophosphorés (COP), les armes chimiques, présentation du VX, dégradation par voie biologique des COP. L'objectif de cette revue est d'une part de présenter la famille des composés organophosphorés en tant qu'insecticides et armes de guerre et d'effectuer la synthèse des connaissances actuelles sur la dégradation abiotique et biologique de ces composés.

1-1 Présentation des composés organophosphorés (COP).

1-1-1 Introduction

La famille des COP est constituée d'une grande diversité de produits xénobiotiques hétéroclites de structure aliphatique ou aromatique dont le point commun est la toxicité sur le système nerveux causée par une inhibition irréversible des cholinestérases (Masson, 1998).

Les COP sont traditionnellement classés en 7 familles :

- phosphates (3 liaisons P-O, 1 liaison P=O),
- thiophosphates (3 liaisons P-O, 1 liaison P=S),
- dithiophosphates (2 liaisons P-O, 1 liaison P=S et 1 liaison P-S),
- phosphonates (2 liaisons P-O, 1 liaison P=O et 1 liaison P-C),
- thiolophosphonates (1 liaison P-O, 1 liaison P=O, 1 liaison P-S et P-R),
- thiolophosphates (2 liaisons P-O, 1 liaison P=O, 1 liaison P-S),
- phosphinates (1 liaison P-O, 1 liaison P=O, 2 liaisons P-R).

Les propriétés physico-chimiques (volatilité, stabilité, solubilité ...), la toxicité et le devenir dans l'environnement des COP sont très variables et dépendent de la nature des substituants (atomes de soufre, oxygène, chaînes latérales ...) liés à l'atome de phosphore et du type de liaisons (covalente ou double liaison) liant le ou les substituants à l'atome de phosphore.

L'utilisation la plus classique des COP est celle de pesticides à usage agricole (phytoprotection). Cependant ils sont aussi employés en médecine vétérinaire (traitements anti-

parasitaires), en santé humaine à visée thérapeutique (EchotophiateTM, MétrifonateTM) ou via les traitements contre les vecteurs de maladies (paludisme...) et insectes nuisibles à l'activité humaine (moustiques, parasites ménagers). La dernière utilisation est la plus dramatique, à savoir celle d'agents chimiques de guerre (Defrank, 1991).

1-1-2 Historique

La chimie des COP est née vers 1820 des expériences de Lassaigne qui fit réagir des alcools avec de l'acide phosphorique. De nombreuses molécules furent synthétisées mais leur véritable intérêt n'apparut qu'en 1937 lorsque Schraeder mit en évidence les propriétés insecticides et acaricides de ces composés (Cassagne, 1996). La chimie de ces produits connut alors un essor important, et dès 1944 le Parathion fut le premier COP insecticide commercialisé. La haute toxicité de certaines de ces molécules, en particulier le tabun (synthétisé en 1936) et le sarin (synthétisé en 1937), suscita l'intérêt des militaires allemands qui pensèrent utiliser ces produits en tant qu'agents chimiques de guerre. Dès 1940, 1000 tonnes mensuelles de tabun étaient produites, cependant ces produits ne furent pas employés pendant la seconde guerre mondiale (Cassagne, 1996). En 1947, Adrian *et al.*, mirent en évidence les propriétés anti-cholinestérasiques des COP. En 1952 trois équipes : Ghost (Angleterre), Shraeder (Allemagne) et Tamelin (Suède) synthétisèrent un nouveau COP, le VX, dont la toxicité en fait un xénobiotique parmi les plus toxique (O'Brien, 1960).

1-1-3 Les COP pesticides

Les insecticides regroupent différentes familles chimiques, en particulier :

- les organochlorés (DDT, lindane...) de toxicité très élevée,
- les organohalogénés (dieldrine...),
- les COP,
- les carbinols,
- les carbamates (Propoxur, Aldicarbe...) qui inhibent les acétylcholinestérasés (Bergé et Pasteur, 1996) mais sont de plus faible toxicité que les COP,
- les pyréthrinoides (perméthrine, cyperméthrine...).

Les COP et organochlorés sont des produits de toxicité équivalente chez les insectes mais l'utilisation des COP est souvent préférée car ils apparaissent comme beaucoup moins

rémanents (Rosenberg et Alexander, 1979), néanmoins la large utilisation des COP a généré l'apparition de souches résistantes d'insectes (Bergé et Pasteur, 1996) le plus souvent par mutation des gènes codant les cholinestérasés ou les enzymes de détoxification.

Le nombre de COP développés à usage de pesticides est important; le malathion (dithiophosphate) et le parathion (thiophosphate) sont parmi les plus utilisés (Kertesz *et al.* 1994). De part la diversité des arrangements chimiques permis par l'atome de phosphore et l'ajout de chaînes latérales, les spectres d'activité de ces produits peuvent être très spécifiques ou au contraire très étendus.

Différents pesticides (malathion, déméton, déméton S-méthyl sulfoxyde, déméton S-méthyl, acéphate ou encore azinophos-éthyl) possèdent un groupement P-S similaire à celui du VX. Ces insecticides à liaison P-S sont décrits comme les COP présentant la plus grande résistance à la dégradation biologique (Hoskin *et al.*, 1995). En revanche les COP avec une liaison P-C sont décrits comme étant beaucoup plus résistants aux dégradations physico-chimiques (Kertesz *et al.*, 1994) que les COP à liaisons P-S en raison de la très grande stabilité chimique et thermique de la liaison P-C.

Les structures chimiques du malathion, déméton S-méthyl sont présentées figure n° 1.

1-1-4 Toxicité des COP

Les COP sont des produits chimiques alkylants inhibiteurs irréversibles des enzymes cholinestérasés (Masson, 1998). Les cholinestérasés sont des enzymes de type hydrolase dont le rôle, dans les organismes possédant un système nerveux, est d'hydrolyser l'acétylcholine qui est un médiateur chimique dit parasymphomimétique (Guyon, 1976). L'acétylcholine présente en excès dans l'organisme est systématiquement hydrolysée par les cholinestérase. L'intoxication par les COP entraîne une inhibition des cholinestérasés dont la conséquence est une accumulation d'acétylcholine au niveau des synapses. L'intoxication par les COP peut avoir différentes voies d'entrée : par le système respiratoire, par contact sur l'œil (COP sous forme d'aérosol), la peau ou les muqueuses. Après contamination les COP diffusent vers le compartiment sanguin et sont véhiculés jusqu'aux synapses cholinergiques (Masson, 1998) où ils se fixent de façon irréversible sur le site estérasiqúe des cholinestérasés (Hoskin, 1995).

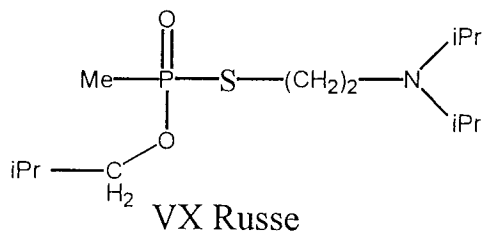
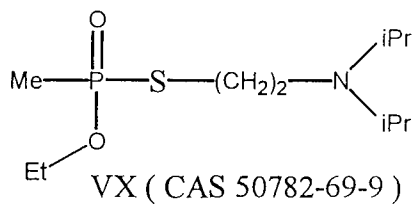
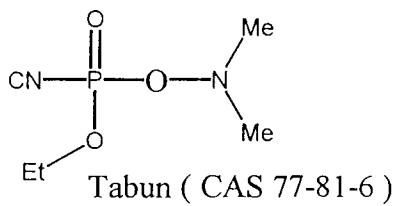
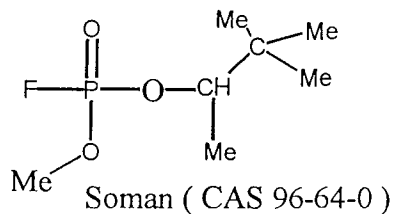
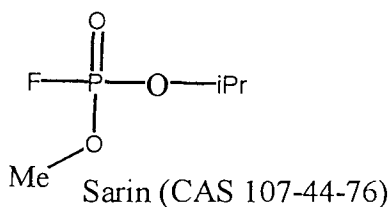
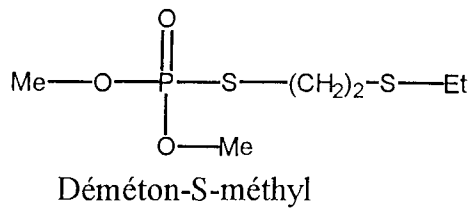
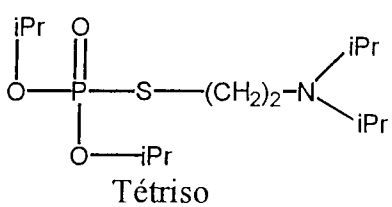
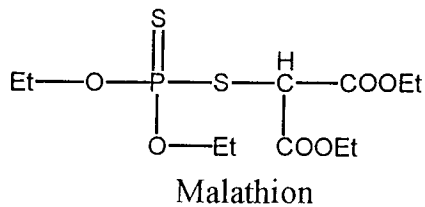
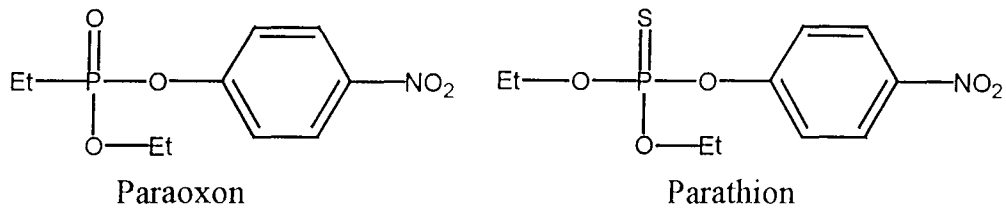


Figure 1 : Formules de quelques composés organophosphorés (insecticides, armes chimiques...).

Dans certains cas, les COP peuvent être stockés dans l'organisme (Bourquin, 1976) et relargués progressivement vers les synapses via la voie sanguine (Masson, 1998). L'inhibition des cholinestérases provoque des symptômes qui apparaissent quelques minutes à quelques heures après l'intoxication (Hilaire, 1995). Les symptômes observés sont nombreux, variables, opposés selon la dose contaminante. A faible dose les neurotoxiques provoquent des effets muscariniques (Vial, 1989), à savoir :

- dilatation des petites artères et capillaires d'où une chute de tension,
- ralentissement du rythme cardiaque,
- augmentation des contractions intestinales et bronchiales,
- myosis,
- augmentation des sécrétions (salivaires, sudorales ...),
- mictions fréquentes et involontaires.

A forte dose les neurotoxiques entraînent des effets nicotiniques (Vial, 1989); à savoir :

- augmentation du rythme cardiaque,
- vasoconstriction
- hypertension
- paralysie des muscles respiratoires.

L'atropine peut annuler les effets muscariniques mais n'a aucune action sur les effets nicotiniques.

Selon la dose, la mort peut être immédiate ou intervenir dans les 24 heures après l'intoxication (Hilaire, 1995). La cause de la mort est le plus souvent l' asphyxie.

La toxicité des COP a été évaluée par différents auteurs (Cassagne, 1996). Elle dépend du mode de contamination et est très variable selon les espèces. Le VX par exemple est plus toxique que les agents de guerre G (soman, sarin et tabun) chez les mammifères (Vial, 1989) mais il est moins toxique pour la daphnie que les agents G (Tonkopp, 1997). Knezevic *et al.* (1993) ont montré que par voie percutanée $7 \text{ mg.kg}^{-1} \cdot 10\text{cm}^{-2}$ de soman entraînait la mort chez le rat en 21 minutes alors qu'il suffisait de $1 \text{ mg.kg}^{-1} \cdot 10\text{cm}^{-2}$ de VX pour obtenir le même effet. Les DL50 (voie orale) du malathion sont de $0,75 \text{ mg.kg}^{-1}$ chez le puceron et de 2000 mg.kg^{-1}

chez le rat; cette différence est due à la transformation chez le puceron du malathion en malaaxon dont la toxicité est supérieure à celle du malathion.

Les doses létales 50 de quelques COP pesticides et de 4 COP agents chimiques de guerre sont données dans le tableau 1.

Il est à noter que la DL50 du paraoxon n'est pas très éloignée de celle des agents G et montre que l'emploi de certains pesticides n'est pas sans danger pour l'utilisateur. Cassagne (1996) indique que l'emploi des COP entraîne environ 14 000 morts/an dans le monde. Worek *et al.* (1998) notent pour leur part que l'usage extensif des COP occasionne 100 000 victimes par an, parmi ces victimes un certain nombre (non précisé) serait dû à des tentatives de suicide par ingestion de COP. Concernant la toxicité du VX chez l'homme, une étude américaine (Etude du passage percutané du VX - Rapport interne CEB n° C.77.C00734) indique que par voie percutanée une dose de VX de $10 \mu\text{g.kg}^{-1}$ inhibe 10 % du taux des cholinestérases alors qu'une dose de VX comprise entre 30 et $35 \mu\text{g.kg}^{-1}$ inhibe 50% de ce taux. L'apparition de symptômes se produit dès que 10% du taux des cholinestérases sont inhibés. Cependant la toxicité des COP ne se limite pas à l'inhibition des cholinestérases. Du fait de leur diversité chimique ils peuvent entraîner d'autres effets toxiques. A titre d'exemple, le glyphosate (phosphonate utilisé comme herbicide) est un inhibiteur de la biosynthèse des acides aminés aromatiques (Kertesz *et al.*, 1994). Le malathion, le déméton ainsi que d'autres COP auraient des effets mutagènes (Dzwonkowka *et al.*, 1986).

1-2 Les armes chimiques.

1-2-1 Introduction

Les agents de guerre chimiques peuvent être classés en différents groupes (Murphy *et al.*, 1984); à savoir :

- les agents neutralisants (lacrymogènes, irritants...) utilisés dans le cadre du maintien de l'ordre,
- les agents incapacitants (psychotropes, analgésiques)

Tableau 1 : D.L.50 (mg/kg i.v. chez le rat) de quelques COP (insecticides ou agents de guerre) d'après Defrank (1991).

Composé	DL 50
Diazinon	150 à 600
Coumaphos	100
Méthyl parathion	14
Parathion	13
Fensulfothion	7
Paraoxon	0,5
Soman	0,01
Tabun	0,01
Sarin	0,01
VX	0,001

- les agents létaux parmi lesquels sont retrouvés les vésicants (ypérite, léwisite, produit T), les hémotoxiques, les suffocants (phosgène) et neurotoxiques (COP) (Mulbry et Rainina, 1998).

Les COP neurotoxiques sont répartis en deux familles (Defrank, 1991); à savoir les agents G (sarin, tabun, soman) et les agents V (VX et RVX). Le R-VX (Rastogi *et al.*, 1997) est l'équivalent russe du VX, sa formule brute est $C_{11}H_{26}NO_2PS$.

Les formules développées des principaux COP à usage militaire sont présentées figure 1. Leur nomenclature fait l'objet du tableau 2.

Tableau 2 : Nomenclature des principaux agents de guerre organophosphorés

	Sarin	Tabun	Soman	VX
Dénomination	GB	GA	GD	A4
Formule brute	$CH_3P(O)(F)OCH(CH_3)_2$	$C_2H_5OP(O)(CN)N(CH_3)_2$	$CH_3P(O)(F)OCH(CH_3)C(CH_3)_3$	$C_{11}H_{26}NO_2PS$
N° Merck index	107-44-8	77-81-6	96-64-0	507-82-69-9
Nomenclature française	méthylfluorophosphonate de O-isopropyle	N-N-diméthylamino-cyanophosphonate de O-éthyle	méthylfluorophosphonate de O-(1,2,2-triméthylpropyle)	Méthylthiophosphonate de O-éthyle S-2 (diisopropylamino)éthyle
Etat (20°)	liquide incolore	liquide incolore	liquide incolore	liquide incolore

Les agents G et V sont les armes chimiques les plus toxiques mais ces agents restent beaucoup moins toxiques que les toxines biologiques militariables. La DL50 de la toxine botulinique A est d'environ $1ng.kg^{-1}$ (voie I.V. chez le rat) contre $1000ng.kg^{-1}$ pour celle du VX dans les mêmes conditions.

1-2-2 Décontamination

L'objet de la décontamination des armes chimiques est de neutraliser l'action des toxiques au contact des matériels (Cassagne, 1996). Deux techniques sont utilisées classiquement :

- déplacement du toxique sans qu'il soit dégradé,
- neutralisation du pouvoir toxique (détoxification) par dégradation.

Le déplacement du toxique est utilisé le plus souvent pour décontaminer la peau (Cassagne, 1996) soit par voie humide (lavage de la peau), soit par voie sèche (application d'un adsorbant). La neutralisation est plutôt utilisée pour les matériels et équipements. L'armée française utilise actuellement pour décontaminer les matériels, 3 solutions décontaminantes :

- solution DS2 (soude 2%, diéthylnetriamine 70%, méthylcellosolve 28%) qui neutralise tous les agents de guerre chimiques,
- solution SDCM F2 (hypochlorite de Ca à 200° chloro 10%, agent mouillant 0,1%, eau 89,9%) spécifique du VX et de l'ypérite,
- solution SDCM F3 (soude 5%, agent mouillant 0,1%, eau 94,5%) active sur les agents G.

L'emploi de ces solutions décontaminantes reste limité en raison de leur caractère très alcalin (Defrank, 1991). Plusieurs voies de recherche proposées pour mettre en œuvre d'autres procédés de décontamination, peuvent être citées :

- détoxification à pH proche de la neutralité sous l'action de réactifs peroxygénés (type monoperoxyphthalate de magnésium : MPPM),
- déplacement du toxique par utilisation de micro-émulsions (Oplustil, 1998) et éventuellement détoxification (inclusion de MPPM ou d'enzymes dans la phase aqueuse de l'émulsion) (Govan et Ward, 1998)
- détoxification par dégradation enzymatique,
- détoxification à la chaleur (Skoumal, 1998 ; Topfer, 1998).

Ces différents procédés présentent chacun des intérêts et donnent des résultats mais le choix d'une méthode par les états-majors repose non seulement sur l'efficacité mais aussi sur des

critères de coût, de facilité d'emploi et de stockage (volume, conditions de conservation, durée de vie ...).

1-3 Le VX.

1-3-1 Caractéristiques physico-chimiques du VX

Le méthylthiophosphonate de O-éthyle S-2 diisopropylamino éthyle (VX), de masse molaire de 267,36 g.mol⁻¹ a pour formule brute C₁₁H₂₆NO₃PS (la formule développée est présentée figure 1), il appartient à la famille des thiophosphonates.

A température ambiante il se présente sous la forme d'un liquide incolore et inodore. Trapp (1985) a décrit ses principales caractéristiques physico-chimiques qui sont résumées tableau 3.

Tableau 3 : Caractéristiques physico-chimiques du VX

pKa (VXN ⁺ H/VX)	8.8
Solubilité dans l'eau à 20°C	1 g.l ⁻¹
Volatilité à 20°C :	1.6 mg.m ⁻³
Densité	1,0143
Indice de réfraction à 20 °C	1,4725
Tension de vapeur	1.4 10 ⁻⁴ mbar
Température de fusion	-39°C
Température d'ébullition	300°C

1-3-2 Dégradation chimique du VX

1-3-2-1 Rôle du pH

La dégradation chimique du VX a principalement été étudiée par Epstein *et al.* (1974) qui ont établi les différents mécanismes d'hydrolyse du VX en milieu aqueux et montré que la réaction est pH dépendante, favorisée par un pH alcalin avec une constante de réaction qui croit de façon exponentielle entre pH 7 et 9. Epstein *et al.* (1974) ont décrit les mécanismes

réactionnels et les produits de dégradation générés en fonction de 3 plages de pH (pH<6, 6<pH<10 et pH>10).

Pour la plage de pH comprise entre 6 et 10 trois réactions sont possibles par rupture de la liaison P-S (réaction principale) et/ou rupture des liaisons C-S et C-O.

La rupture de la liaison P-S entraîne la formation de 2 composés qui sont l'acide éthyl méthylphosphonique (EMPA) et le diisopropylaminoéthanthiol (DPAT). En milieu basique le DPAT peut s'oxyder pour former du bis-2-diisopropylaminoethyl disulfure. Les formules de ces composés sont données Figure 2.



Bis-2-diisopropylaminoethyl disulfure

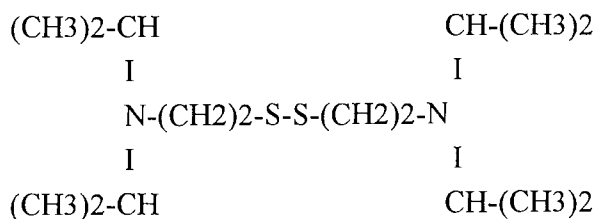


Figure 2 : Formules développées des produits de dégradation du VX après rupture de la liaison P-S.

Cassagne (1996) a effectué la synthèse des différents résultats obtenus par 3 équipes (Epstein *et al.*, 1974 ; Hovanec *et al.*, 1993 ; Yang *et al.*, 1993) en fonction des plages de pH en milieu aqueux. Les principales réactions observées et produits de dégradation générés sont décrits ci-dessous.

A $\text{pH} < 7$, rupture de la liaison P-S, le temps de demi-vie estimée par Hovanec *et al.* (1993) est de 100 heures à 25°C mais les conditions opératoires ne sont pas précisées.

A $7 < \text{pH} < 10$, plusieurs voies réactionnelles sont possibles, la principale entraîne une rupture de la liaison P-S; la seconde due à une attaque nucléophile intramoléculaire de l'atome d'azote sur l'atome de carbone en α de l'atome de soufre conduit à une rupture de la liaison C-S entraînant la formation d'un composé toxique l'acide O-éthyl méthylthiophosphonique; la troisième voie (rupture de la liaison C-O) conduit par attaque nucléophile à l'acide diisopropylaminoéthyl méthylphosphonique lui aussi toxique. Dans cette plage de pH les cinétiques de dégradation chimique du VX suivent des cinétiques d'ordre 1; des constantes de vitesse d'hydrolyse du VX ont été proposées par différentes équipes (Tableau 4).

Tableau 4: Constante de vitesse d'hydrolyse du VX à pH proche de la neutralité.

(VX) mol.L ⁻¹	pH	T °C	Kobs 10 ⁻³ h ⁻¹	Références
10 ⁻³	7,2	25	5,56	Epstein <i>et al.</i> (1974)
8,6.10 ⁻⁵	8	25	3,77	Epstein <i>et al.</i> (1974)
1,87.10 ⁻²	entre 7 et 8	21	12,1	Szafraniec (1990)
3,75 10 ⁻⁴	7,2	22	2,96	Crenshaw (1994)
1,87.10 ⁻⁴	7,5	28	2	Hilaire (1995)
1,87.10 ⁻⁴	8,5	28	9	Hilaire (1995)
0,3.10 ⁻³	8	28	13	Bezeau (1996)

A $\text{pH} > 10$, Epstein *et al.* (1974) considèrent que seule la liaison P-S est hydrolysée alors que Yang *et al.* (1992) mettent en évidence la formation du EMPA (87%) et de l'acide diisopropylaminoéthyl méthylphosphonique (13%) indiquant des ruptures des liaisons P-S et C-O.

D'après Epstein *et al.* (1974) la dégradation abiotique du VX occasionnée par le pH devient plus rapide à partir d'un $\text{pH} > 7,5$.

1-3-2-2 Autres facteurs

Conjointement à l'effet du pH sur la dégradation chimique du VX, différents facteurs peuvent favoriser cette dégradation. Hilaire (1995) et Bezeau (1996) ont montré que l'oxygène dissous apparaissait comme un facteur non négligeable dans la dégradation abiotique du VX. En particulier Bezeau (1996) a montré qu'après incubation sans micro-organismes pendant 7 jours de 1 mg.L⁻¹ de VX en aérobiose et anaérobiose dans les mêmes conditions opératoires (pH7,5, 28°C, 200 rpm, milieu aqueux à base minérale + glucose 5 g.L⁻¹ et extrait de levure 0,2 g.L⁻¹), 97% du VX étaient dégradés en aérobiose contre 15% en anaérobiose. Hilaire (1995) a montré que des résultats identiques étaient obtenus à pH 8,5 (milieu Tris 20mM) en réacteur aéré sous flux d'azote ou d'air (débit de 0,3L.min⁻¹). En 6 jours 70% du VX (50 mg.L⁻¹) étaient dégradés en présence d'air contre 40% en présence d'azote. Mengyue *et al.* (1995) observent lors de l'étude de la photodégradation catalysée par des films de TiO₂ (0,62g) de 4 COP (dichlorvos, monocrotophos, parathion et phorate) en milieu aqueux (eau désionisée) que le taux de dégradation est favorisée par l'apport d'air.

Bezeau (1996) indique que la dégradation du VX augmente lorsque la concentration en extrait de levure du milieu de culture augmente (essais réalisés avec 0,2 et 20 g.L⁻¹ d'extrait de levure). Le rôle de l'extrait de levure sur la dégradation de 4 COP (méthyl parathion, parathion, feritrothion) a été constaté par Ohshiro *et al.* (1996).

D'autres facteurs (ions, matières organiques) interviennent vraisemblablement dans la dégradation du VX car Crenshaw *et al.* (1994) ont obtenu des durées de demi-vie du VX (concentration initiale non précisée) de 9,9 à 40 jours à 25°C et pH7 en présence d'eau d'origine différente.

1-3-3 Dosage du VX.

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est la méthode de référence. Verweij et Boter (1976), Colwell *et al.* (1989), Hilaire *et al.* (1995) dosent le VX par cette méthode après extraction dans un solvant organique. Bezeau (1996) a montré que le suivi de la dégradation du VX par CPG après extraction liquide/liquide était tout à fait adapté aux milieux biologiques.

La RMN 31P est utilisée par Lai *et al.* (1995) et Kolakowski *et al.* (1997) pour la mise en évidence de la rupture de la liaison P-S de COP insecticides (déméton S-méthyl par exemple) et du VX. Cette technique est qualitative mais peut être utilisée en mode quantitatif en ajoutant un étalon interne.

La réaction enzymatique d'inhibition de la cholinestérase a été utilisée par Fu et Sun (1989), Grognet *et al.* (1993). Cette méthode permet d'associer la dégradation et la détoxification.

La méthode d'Ellman dont le principe est la mise en évidence du clivage de la liaison P-S qui entraîne la formation d'un thiol réagissant avec le DTNB pour former le TNB (5'-thiol-nitrobenzoate) chromogène absorbant à 412nm a été employée par Lai *et al.* (1994), Hoskin *et al.* (1995), Hoskin *et al.* (1997), Kolakowski *et al.* (1997), Rastogi *et al.* (1997) pour suivre l'hydrolyse du VX par l'OPH.

L'utilisation de l'électrophorèse capillaire a été proposée par Kostianen *et al.* (1993) et Pianetti *et al.* (1993) pour détecter et doser les agents de guerre organophosphorés ainsi que certains pesticides organophosphorés. Cette technique pourra vraisemblablement être utilisée pour le VX dans l'avenir avec l'avantage d'éviter l'étape d'extraction.

Le dosage immuno-enzymatique décrit pour certains pesticides, adapté au parathion (Francis et Craston, 1994) n'est pas applicable au VX car il n'existe pas anticorps anti-VX d'affinité suffisante (Grognet *et al.*, 1993).

1-4 **Dégradation des COP**

1-4-1 Introduction

Ce paragraphe a pour objectif de faire la synthèse des connaissances actuelles sur la dégradation en général des COP pesticides et militaires. Nous développerons tout d'abord les facteurs intervenant sur le devenir des COP dans l'environnement puis nous intéresserons à la dégradation biologique des COP pesticides, des COP militaires et enfin à celle du VX.

1-4-2 Dégradation des COP dans l'environnement.

Un COP peut, dans l'environnement, être éliminé ou au contraire être concentré ou accumulé. L'élimination peut être due à un ou plusieurs facteurs tels l'adsorption (Tsezos et

Wornj, 1991), la volatilisation, l'évaporation, la photooxydation, la dégradation chimique (Anderson, 1989; Schwarzenbach *et al.*, 1993), la dégradation biologique. Ahmad *et al.* (1979) indiquent que la dégradation de 3 COP pesticides (fonofos, phorate et terbufos) est influencée par plusieurs facteurs : pH , composition du milieu réactionnel, taux d'humidité, luminosité, température. Lydy *et al.* (1990) ont étudié l'effet de 3 paramètres (pH, température, sédiments) sur la dégradation et la toxicité (chez la larve *Chironomus riparius*) du parathion en milieux aqueux. Ils concluent que la température est le facteur le plus influent sur la dégradation du parathion dont le taux de transformation en paraoxon augmente avec la température (valeurs testées 10, 20 et 30°C). En contrepartie, le pH (valeurs testées 4, 6 et 8) a peu d'influence sur la dégradation. Chapman et Harris (1980) constatent lors de l'étude de la persistance de 3 COP (terbufos, terbufos sulfoxyde et terbufos sulfone) dans le sol que la volatilisation serait le facteur majeur d'élimination du terbufos. Le rôle de la volatilisation est très variable selon les COP. Topfer (2000) a indiqué les valeurs suivantes de volatilité ($\text{mg}\cdot\text{m}^{-3}$ à 20°C) pour les quatre neurotoxiques agents de guerre : sarin : 2250, tabun : 560, soman : 2,060 et VX : 1,6. Le VX est le moins volatil des COP militaires.

La sorption des COP a été très peu étudiée. Lydy *et al.* (1990) ont observé que la présence de sédiments avait pour effet de diminuer la dégradation du parathion en milieu aqueux par effet de sorption, celle-ci étant plus importante à 30°C qu'à 10°C. D'après Jamet et Piedallu (1978) le terbufos est adsorbé rapidement par la matière organique présente dans le sol. Kenneth *et al.* (1988) indiquent que l'adsorption des pesticides dans le sol augmente proportionnellement au taux de matières organiques ce qui les rend moins aptes à la biodégradation. Lors d'études de la biodégradation du déméton-S-méthyle, Jacquot (1995) et Jorand *et al.* (1997) constatent que cet organosphosphoré n'est pas adsorbé par les micro-organismes. Hilaire (1995) a effectué les mêmes remarques pour le VX. Par contre Mauret et Serph (1994) ont observé, lors de l'étude de la dégradation du déméton ($50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) par une boue activée en réacteur alimenté par de l'acétate de sodium ($300 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) selon un mode discontinu, qu'après 16 jours d'incubation, 40 à 50 % du déméton étaient adsorbés par la boue. Ils n'ont pas précisé si le déméton était adsorbé sur les micro-organismes ou sur les particules en suspension.

La dégradation d'un xénobiotique est généralement jugée comme un processus positif et favorable mais pour certains COP, leur dégradation conduit à l'apparition de produits plus toxiques que le composé initial ; à titre d'exemple le paraoxon est plus toxique que le parathion, il en est de même pour le malaaxon et le malathion (Lydy *et al.*, 1990 ; Hoskin *et al.*, 1997).

1-4-3 Biodégradation des COP.

1-4-3-1 Introduction.

L'étude de la dégradation biologique des COP est appréhendée de façon différente selon l'utilisation du COP en tant que pesticide ou en tant qu'agent chimique de guerre.

Les travaux relatifs à la dégradation biologique des COP pesticides s'attachent principalement à déterminer la durée de vie du COP dans l'environnement, d'identifier les paramètres physico-chimiques et les micro-organismes qui influent sur le devenir du produit dans l'environnement. Ces travaux présentent à la fois des intérêts économiques (Forrest *et al.*, 1981) et scientifiques :

- Economiques dans la mesure où un COP pesticide biodégradé très rapidement devient inefficace et ne remplit plus son rôle protecteur des récoltes, ce qui implique des surcoûts dus à l'augmentation des doses ou à l'application d'un traitement avec un nouveau pesticide. Forrest *et al.* (1981) ont décrit la perte d'efficacité du diazinon contre le puceron des salades. Après avoir suspecté dans un premier temps la résistance du puceron au diazinon, ils ont mis en évidence que l'utilisation répétée de cet insecticide pendant 3 ans avait sélectionné une population microbienne capable de le dégrader.

- Scientifiques car il est important de déterminer les mécanismes de dégradation des COP par les micro-organismes, d'identifier les sites d'attaque, les voies métaboliques impliquées et les produits de dégradation. Toutes ces données sont nécessaires pour évaluer la durée de vie des COP et leur incidence sur l'environnement. Elles peuvent également aider à la recherche de nouvelles formulations mieux adaptées à l'environnement.

Les recherches sur la dégradation biologique des COP agents militaires ont pour objectif de cribler, sélectionner et caractériser des enzymes capables de détoxifier ces agents

pour utiliser ces enzymes pour la décontamination des matériels et équipements ou en traitement thérapeutique (Masson, 1998).

1-4-3-2 COP pesticides

En règle générale, les COP pesticides sont le plus souvent considérés comme non persistants et dégradables par les micro-organismes (Kertesz *et al.*, 1994). De nombreuses études portent sur leur mode d'utilisation par les micro-organismes comme source de carbone (C), phosphore (P), d'azote (N) ou soufre (S). Les micro-organismes d'essai sont le plus souvent originaires du sol.

Les COP sont très peu utilisés comme source de carbone : Kenneth *et al.* (1988) indiquent néanmoins que des souches bactériennes de *Pseudomonas* et d'*Arthrobacter* seraient capables de métaboliser l'isofenphos (COP aromatique) comme source de C mais il ressort généralement que la dégradation de ces produits n'est pratiquement possible que par cométabolisme (présence obligatoire d'un substrat complémentaire pour apporter la source de C et d'énergie (Horvath, 1972 ; Dalton et Stirling, 1982).

Rosenberg et Alexander (1979) ont étudié la capacité de 12 microorganismes provenant du sol à dégrader 12 COP (dont le malathion, le parathion et le méthyl parathion) comme source de P (0,12 mM) ou de C. Aucun de ces trois COP n'a pu supporter la croissance microbienne mais tous ont été utilisés comme source de P. Deux bactéries de la famille des *Pseudomonas* sont capables de métaboliser respectivement 10 et 9 COP comme source de P. Les extraits intracellulaires (0,7 à 1mg de protéines par ml), préparés à partir de ces 2 bactéries - prélevées en début de phase stationnaire et lysées aux ultrasons - ont été testés sur les 12 COP (0,1 M). Les 2 extraits sont incapables de dégrader 3 COP insecticides (DyloxTM, VaponaTM et méthyl parathion) mais dégradent les 9 autres, les vitesses de dégradation restent cependant très faibles (2,4 à 8,6 nmol par min et mg de protéines). L'identification des produits de dégradation par GC-MS indique que les COP sont dégradés sous l'action de phosphatases et de phosphotriestérases.

La dégradation de la liaison P-C de la famille des organophosphonates (composé possédant 2 liaisons P-O, 1 liaison P=O et 1 liaison P-C) a été largement étudiée et a permis de

démontrer que le clivage de cette liaison était l'étape préalable à la minéralisation (Schowanek et Verstraete, 1990). McGrath *et al.* (1997) ont testé in vitro la capacité d'une centaine de micro-organismes de l'environnement à dégrader 19 COP à liaison P-C (0,001 à 0,01 mol.L⁻¹) en milieu de culture minéral (pH=7,5 - 27°C) avec ou sans source de carbone et/ou de phosphore et/ou d'azote. Les auteurs constatent que

- 19 COP sont utilisés comme seule source de phosphore,
- 4 servent à la fois de source de carbone et phosphore,
- 4 COP aminoalkylphosphonate parmi les 5 testés sont utilisés comme source d'azote en présence d'une source de phosphate minérale, mais 2 composés seulement sont utilisables à la fois comme source d'azote et de phosphore,
- 1 COP le 2-aminoéthylphosphonate est utilisé :
 - comme source de phosphore par toutes les bactéries mises en essai,
 - comme source d'azote par 60% des bactéries testées,
 - comme source d'azote et de phosphore par 10% des bactéries,
 - comme source d'azote, de phosphore et de carbone par 2% des bactéries.

Ces différents résultats montrent en premier lieu qu'un COP, aux concentrations employées, est difficilement utilisable à la fois comme sources de C, P, N. L'explication étant que les bactéries capables de métaboliser les organophosphonates utiliseraient des voies bien distinctes du métabolisme du phosphore, de l'azote et du carbone (Cook, 1988). Il apparaît ensuite que le clivage de la liaison P-C ne se produit que lorsque les bactéries n'ont pas de source de P autre que le COP, ce qui avait déjà été indiqué par Wanner (1994). Les enzymes impliquées dans la rupture de la liaison P-C sont généralement appelées "C-P lyase" (Kertesz *et al.*, 1994) et pourraient être sous contrôle du régulon *pho* (Lee *et al.*, 1992; Wanner, 1994). Chez *E.coli*, le régulon *pho* met en jeu environ 80 protéines dont le taux d'expression augmente lors de la carence en phosphate minéral (Torriani, 1990). Le rôle d'inhibition du phosphate minéral sur l'utilisation des COP à liaison P-C a été observé chez différents microorganismes; à titre d'exemple l'activité phosphotriestérasique de *Pseudomonas* est inexistante lors de la croissance de ces bactéries en milieu de culture contenant du phosphate minéral. Cependant la répression due au phosphate minéral ne se limiterait pas uniquement aux

enzymes de dégradation mais aurait également un rôle sur les enzymes de transport. En effet, il a été observé (Kertesz *et al.*, 1994) que l'ajout de phosphate minéral lors de la croissance d'*Agrobacterium radiobacter* et d'*Arthrobacter sp* entraînait la répression de l'enzyme phosphonate transport. De même chez *Pseudomonas sp* PG2982, il a été observé que le transport du glyphosate (COP phosphonate employé comme herbicide) n'était possible qu'en absence de phosphate minéral.

L'inhibition par le phosphate minéral sur la dégradation des COP n'est pas cependant une constante applicable à l'ensemble des COP mais est plutôt observée chez la famille des phosphonates. L'étude du comportement d'autres familles de COP en présence de micro-organismes, montre que des biodégradations se produisent même en présence d'une source de P autre que le COP. Forrest *et al.* (1981) indiquent que le diazinon, le parathion et le paraoxon se dégradent biologiquement en milieu minéral contenant du tampon phosphate à 0,9 g.L⁻¹ (bactéries en culture) et en tampon phosphate (suspension de micro-organismes lavés et repris dans le tampon). De même, Oshiro *et al.* (1996) utilisent un milieu de culture contenant 0,2 g.L⁻¹ de KH₂PO₄ et 0,5 g.L⁻¹ de K₂HPO₄ pour déterminer la biodégradation de 9 COP insecticides par une souche d'*Arthrobacter sp* souche B5. La souche dégrade totalement 6 COP pendant la phase de croissance tandis que 2 autres (toclofos-méthyl, éthoprophos) sont partiellement dégradés pendant la phase stationnaire.

Concernant les pesticides à liaison P-S, les travaux sont peu nombreux et la littérature est peu documentée. Le phorate et le malathion (liaisons P-S et P=S) ont été décrits comme biodégradables. Ahmed et Casida (1958) indiquent que le phorate ainsi que deux composés très proches (phorate sulfone et phorate sulfoxyde) seraient utilisables par des micro-organismes du sol comme source d'énergie. Différents micro-organismes ont été reportés comme capables de dégrader ces composés. *Bacillus subtilis* (Yasumo *et al.*, 1965 ; *Pseudomonas sp* (Tiedje *et al.*, 1969), *Pseudomonas cepacia* et *putida* (Paris *et al.*, 1975, Rosenberg et Alexander 1979), *Arthrobacter sp* (Walker *et al.*, 1974), *Flavobacterium sp* (Sethunathan *et al.*, 1973), *Flavobacterium meningosepticum* (Paris *et al.*, 1975). *Aspergillus niger* et *Trichoderma viride* (Matsumura et Boush 1968 ; Mosfata *et al.*, 1972) ont été cités pour leur capacité à dégrader le malathion. Concernant le phorate, sont nommés *Pseudomonas*

fluorescens (Ahmed et Casida, 1958) et *Bacillus megaterium* (Le Partourel et Wright, 1976). Concernant le déméton (autre insecticide à liaison P-S) et ses dérivés, les travaux sont encore moins nombreux. L'équipe de Ziegler *et al.* (1980) a indiqué la capacité de bactéries (en culture pure) isolées du sol à dégrader le déméton-S-méthyl sulfoxide. Deux bactéries *Rhodococcus ruber* DSM 43252 et *Pseudomonas putida* paraissent dégrader par cométabolisme (présence de fumarate 2 g.L^{-1}) 2 mM de déméton S méthyl sulfoxide en 13 jours. Il est à regretter que les auteurs n'aient pas évalué si l'élimination du xénobiotique était totalement due à une activité biologique ou aidée par des phénomènes conjoints (adsorption sur les micro-organismes, dégradation chimique ...). Mauret et Serph (1994) ont étudié le comportement du déméton (50 mg.L^{-1}) en présence d'une boue activée en réacteur alimenté par de l'acétate de sodium (300 mg.L^{-1}) selon un mode discontinu. Ils observent qu'après 16 jours d'incubation la totalité du déméton disparaît mais 40 à 50 % sont adsorbés par la boue. D'après le témoin abiotique, 25 à 30 mg.L^{-1} de COP se dégradent en 10 jours selon un mode physico-chimique. La dégradation du déméton n'a donc pu être reliée à une activité biologique effective. Cependant Jacquot (1995) indique que *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13745 serait capable de dégrader le déméton-S-méthyl. Cette dégradation se produirait par cométabolisme. 3 sources de carbone différentes ont été utilisées : acétate de sodium, fumarate et glucose. Le taux de dégradation du déméton varie en fonction du co-substrat. L'acétate permet d'obtenir le taux de dégradation le plus important, viennent ensuite le fumarate puis le glucose. Ces résultats indiquent que la dégradation du déméton est favorisée par la présence d'une source de carbone alcalinisant le milieu. La métabolisation de l'acétate et du fumarate alcalinise en effet le milieu alors que l'utilisation du glucose l'acidifie (Cocaign *et al.*, 1993). Les résultats de Jacquot ne permettent pas cependant de déterminer catégoriquement si la dégradation du déméton-S-méthyle est d'origine biologique ou chimique du fait de l'augmentation du pH durant la croissance de *Corynebacterium glutamicum* en présence d'acétate ou du fumarate. La dégradation biologique d'un autre COP à liaison P-S, le tétriso (O,O-diisopropyl S-(2-diisopropylaminoethyl phosphorothiolate) dont la structure chimique est présentée Figure 1 a été étudiée. Ce produit qui n'est ni utilisé comme insecticide ni comme arme chimique, est un analogue structural du VX. Bien que de nombreuses équipes

américaines aient testé la capacité de différentes bactéries à biodégrader le tétriso, seuls Cork *et al.* (1984) ont indiqué que ce produit était biodégradé par *Bacillus cereus* pendant la phase stationnaire de culture. Un enzyme exo cellulaire serait responsable de la dégradation du tétriso. Cork *et al.* (1984) envisageaient de produire en fermenteur une grande quantité de surnageant de *Bacillus cereus* pour purifier l'enzyme putative mais aucune publication n'a fait état de la réalisation de ce projet ni des résultats obtenus, depuis leur première annonce.

1-4-3-3 COP militaires (Agents G)

L'étude de la dégradation par voie biologique des agents G a été initiée par Mazur (1946). Dans un premier temps, différentes équipes (Mounter, 1953, 1955, 1956, 1963 ; Augustinson, 1954, 1955; Adie, 1956, 1958; Main, 1960) ont montré que des solutions protéiques provenant de différents tissus animaux étaient capables d'hydrolyser les agents G (rupture de la liaison P-O). Les travaux d'Hoskin (1969, 1971, 1972, 1976) et Hoskin *et al.* (1984) montrèrent que deux types d'enzymes d'origine animale nommés DFPases "Mazur-type" ou "Squid-type" étaient capables de catalyser l'hydrolyse des agents G. Ces DFPases peuvent avoir des origines variées par exemple rein de cochon (Broomfield, 1992), foie de rat (Little *et al.*, 1989), palourdes (Defrank, 1991), sérum de crapaud (Mei-Zhen *et al.*, 1992), sérum de mammifères (Defrank, 1988), calmar (Hoskin *et al.*, 1984, Wang *et al.*, 1993). Ces DFPases sont actives sur un ou plusieurs agents G (Wang *et al.*, 1993).

Bien que Mounter ait montré dès 1955 que des bactéries gram - (*Proteus vulgaris*, *Pseudomonas diminuta*) étaient capables d'hydrolyser certains agents G, l'étude de la dégradation des agents G par les microorganismes a été plus tardive et débuta au début des années 70 quand Sethunatham et Yoshida (1973) montrèrent qu'un extrait cellulaire de *Flavobacterium sp* pouvait hydrolyser différents pesticides organophosphorés. 3 groupes d'enzymes microbiens similaires aux DFPases furent décrits comme capables de détoxifier les agents G (Defrank, 1991), à savoir :

- "parathion hydrolase",
- "thermophilic bacterial organophosphorous anhydrase" dont l'enzyme caractéristique est produite par la souche *Bacillus stearotherophilus* J.D-100,

- "halophilic bacterial organophosphorous acid anhydrase" dont l'enzyme type est produite par la souche *Alteromonas* JD6.5.

Lors d'une réunion d'un groupe de travail américain sur les DFPases à Woods-Hole, Maryland, en juin 1987, il a été décidé de donner le nom de OPAA (OrganoPhosphorus Acid Anhydrase) à ces trois familles d'enzymes capables de détoxifier les agents G, mais incapables de dégrader le VX (Defrank, 1991). Des essais terrains effectués dans le cadre du PG 31 au Centre d'Etudes du Bouchet à Cazaux, ont montré la possibilité de décontaminer en 15 minutes avec une OPAA (provenant d' *Alteromonas* JD6.5 ou de *Loligo vulgaris*) des plaques métalliques recouvertes de peinture polyuréthane contaminées par du soman à la concentration de 10 g.m⁻² (Hilaire *et al.*, 1998). Ces essais "terrain" montrent que le procédé enzymatique de décontamination est opérationnel et répond aux critères de décontamination requis pour les décontaminants chimiques.

Une interrogation résidait sur le rôle et la présence constitutive des OPAA chez de nombreux organismes tant eucaryotes que procaryotes et sur leur rôle physiologique. Cheng *et al.* (1995) ont apporté des éléments de réponse en montrant que les OPAA, dans leur majorité, présentaient des homologies de séquences d'acides aminés avec des enzymes de type peptidases, dipeptidases. Les OPAA seraient donc des peptidases ubiquitaires possédant des spécificités de substrat peu marquées.

Des travaux postérieurs à la classification de 1987 ont montré que l'enzyme "parathion hydrolase" est une paraoxonase phosphotriestérase capable d'hydrolyser un grand nombre de COP aromatiques à liaison P-O (Dumas *et al.*, 1989) ; de ce fait, son appellation est devenue OPH pour "organophosphate hydrolysing enzyme". L'OPH phosphotriestérase (référéncée EC 8.13.1) décrite par Dumas *et al.* (1989) est une métalloenzyme codée par un gène plasmidique (opd) commun à deux espèces bactériennes *Pseudomonas diminuta* MG et *Flavobacterium sp* ATCC 27551 (Lai *et al.*, 1994). L'enzyme est synthétisée sous la forme d'un précurseur dimérique de 78 kD possédant un peptide signal de 29 acides aminés. La forme mature est un dimère de 72 kD comprenant 336 acides aminés. Dans les conditions naturelles, le zinc est un cofacteur indispensable à l'activité catalytique mais il peut être remplacé par le cobalt qui a pour effet d'augmenter son efficacité catalytique (Lai *et al.*, 1994). Dumas *et al.* (1990) ont

montré l'aptitude de cette enzyme à hydrolyser la liaison P-F du soman et du sarin qui est hydrolysé beaucoup plus rapidement que le soman. En 1995, l'équipe de Lai *et al.* indiquait que l'OPH était capable d'hydrolyser les liaisons P-CN (tabun) et P-S de 5 insecticides (acéphate, azinophos-éthyl, déméton-S, malathion et phosalone) mais avec des efficacités catalytiques très faibles (kcat -constante catalytique- de la liaison P-S du déméton-S égal à $1,3 \text{ s}^{-1}$ alors que la kcat de la liaison P-O du paraoxon est de 3170 s^{-1}). Toujours en 1995, Hoskin *et al.* indiquaient qu'une OPH génétiquement modifiée dégrade le tétriso mais la vitesse d'hydrolyse reste faible ($60 \mu\text{M.h}^{-1}$) ; cependant, l'enzyme native n'hydrolyse pas le tétriso. En 1997, Hoskin et Walker confirment la capacité de l'OPH génétiquement modifiée à hydrolyser la liaison P-S du tétriso et du malathion (0,4 M). La vitesse d'hydrolyse est de $18,5 \mu\text{M.h}^{-1}$ pour le malathion et de $77 \mu\text{M.h}^{-1}$ pour le tétriso (Hoskin et Walker, 1997). L'OPH présente in vitro des propriétés intéressantes pour dégrader les agents G et un grand nombre de COP pesticides, mais cette enzyme n'a pas été testée dans les conditions opérationnelles comme cela a été fait pour les OPAA et ne permet pas de dire si son utilisation sera possible sur le terrain.

Les perspectives actuelles sont d'immobiliser l'OPH sur différentes matrices en vue de l'utilisation de cet enzyme pour :

- dégradation in situ (Ember, 1997) sous l'action d'enzymes immobilisés sur différents supports (filtres de masque à gaz, combinaison NBC, éponge polyuréthane),
- détection des COP pesticides et agents de guerre.

1-4-3-4 VX

La dégradation biologique du VX est présentée sous deux aspects; à savoir :

- en présence de micro-organismes,
- en présence d'enzymes.

1-4-3-4-1 Dégradation en présence de micro-organismes.

Holwerda (1975) a indiqué que l'injection de VX dans des échantillons de terre (1 mg de VX par g de terre) augmentait le nombre de micro-organismes, mais un processus de biodégradation du VX n'a pu être démontré. Verweij et Boter (1976) ont suivi le devenir du

VX dans 3 échantillons de sols différents et recherché les produits de dégradation décrits par Epstein *et al.* (1974). Ils ont observé une première phase rapide de disparition puis une plus lente, mais n'ont pas mis en évidence l'origine biologique et/ou physico-chimique de la disparition du VX. De même l'adsorption éventuelle du VX n'a pas été quantifiée. Colwell *et al.* (1989) ont isolé à partir de sédiments marins 6 souches bactériennes (*Pseudomonas sp* et *Pseudomonas stutzeri*, *Vibrio fluvialis* et *mereis*, *Alteromonas putrefaciens*, *Agrobacterium sp*) capables d'utiliser comme source de carbone et phosphore deux analogues structuraux du VX et ont évalué l'action des 6 souches en culture pure sur le VX. Il est apparu que la disparition du VX suivait une cinétique d'ordre 1 et était liée à l'élévation du pH réactionnel occasionnée par la croissance des microorganismes. Colwell *et al.* (1989) concluaient que la dégradation du VX était d'origine chimique due à l'alcalinisation du milieu. Hilaire (1995) indique que deux micro-organismes (*Alternaria tenuis*, *Rhodococcus ruber*) augmentent le taux de dégradation du VX (concentration initiale = 50 mg.L⁻¹) en cométabolisme en présence de glucose ou glycérol (1 g.L⁻¹). *Alternaria tenuis* en particulier dégrade 30 mg.L⁻¹ de VX en 5 jours alors que 10 mg.L⁻¹ seulement sont dégradés dans les mêmes conditions en milieu abiotique (28°C - pH 7,5 - 200 rpm). Bezeau (1996) indique que 3 souches bactériennes (*Rhodococcus ruber*, *Bacillus sphaericus* et *Corynebacterium glutamicum*) biodégraderaient le VX. L'activité "anti-VX" de *Rhodococcus ruber* serait exo cellulaire. Rastogi *et al.* (1997), Defrank *et al.* (1998) ont étudié la biodégradation de produits de dégradation du VX obtenus après hydrolyse chimique de la liaison P-S. Rastogi *et al.* (1997) se sont intéressés au devenir de l'acide S-diisopropylamino éthyl méthyl phosphonique (EA2192) qui est formé lors de l'hydrolyse alcaline à pH > 10. Le EA2192 pourrait représenter jusqu'à 10% des produits de dégradation dans cette zone de pH. La liaison P-S de l'EA2192 serait hydrolysée par une boue activée; des extraits intra cellulaires préparés à partir des micro-organismes isolés de la boue dégradent le EA2192 avec une vitesse de 3,7 μM.h⁻¹.mg⁻¹ de protéines (détermination par la méthode d'Ellman). De plus, le pH, la température de travail et le taux de dégradation abiotique ne sont pas précisés par les auteurs. Defrank *et al.* (1998) étudient le devenir du EMPA et du DPAT deux produits de dégradation du VX en présence de micro-organismes. Defrank *et al.* (1998) hydrolysent tout d'abord le VX (coupure de la liaison P-S) dans l'eau

pendant 90 jours à température ambiante ou par chauffage 2 heures à 90°C. L'EMPA et le DPAT formés par rupture de la liaison P-S sont ensuite mis en présence de consortia bactériens provenant de l'environnement (sols agricoles, eau de rivière ...) avec les conditions opératoires suivantes : aérobiose, pH 7, co-métabolisme. Les 2 produits sont dégradés. L'EMPA est transformé en MPA (acide méthylphosphonique) sous l'action d'une phosphatase. Le MPA est déméthylé sous l'action d'une C-P lyase en absence de source de phosphore annexe. La C-P lyase qui intervient en amont dans la biodégradation des COP organophosphonates (Kertesz *et al.*, 1994) a un rôle différent dans la biodégradation du VX car elle n'a pas d'activité sur le VX lui-même mais seulement sur un de ces produits de dégradation.

Les différents résultats publiés sur la dégradation du VX en présence de micro-organismes n'identifient aucun micro-organisme capable de biodégrader ce composé.

1-4-3-4-2 Dégradation enzymatique du VX

Hoskin et Walker (1997) notent qu'un grand nombre d'extraits protéiques provenant d'eucaryotes et procaryotes ont été testés en vain pour déterminer leur éventuelle capacité à dégrader différents COP à liaison P-S dont le VX. Seule l' Organophosphorus hydrolase (OPH) modifiée génétiquement (coupure d'une séquence de 29 acides aminés) a été décrite comme capable d'hydrolyser la liaison P-S des COP, Kolakowski *et al.* (1993) ont indiqué les premiers que l'enzyme OPH hydrolyse faiblement la liaison P-S du VX à 25°C et pH 8,5. Cette enzyme nécessite cependant la présence d'un cofacteur (cobalt ou zinc) pour être active. Ces résultats ont été complétés par Hoskin *et al.* (1995) qui estimèrent la vitesse d'hydrolyse du VX à 150 $\mu\text{M}\cdot\text{h}^{-1}$. Kolakowski *et al.* (1997) ont publié des résultats complémentaires sur l'hydrolyse de la liaison P-S. Il ont indiqué que taux d'hydrolyse du VX (0,5 mM) à pH 8,5 et 25°C en présence d'OPH (forme Co^{2+}) est de 9,6 $\mu\text{M}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ soit 10 fois plus important qu'avec la forme Zn^{2+} . Les auteurs estiment que l'hydrolyse spontanée du VX est nulle, ce qui est étonnant car à pH 8,5 la constante de vitesse de la réaction d'hydrolyse chimique est de l'ordre de 8.10⁻³ h⁻¹ (Epstein *et al.*, 1974). Rastogi *et al.* (1997) ont comparé les vitesses d'hydrolyse du R-VX et VX (0,2 mM) en présence d'OPH (forme Co^{2+}). Les résultats

indiquent qu'à pH 8 les constantes d'affinité (K_m) de l'enzyme sont identiques pour les 2 COP, soit environ 450 μM . La vitesse d'hydrolyse du R-VX est environ 3 fois supérieure à celle du VX ($126 \mu\text{M}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ et $33,6 \mu\text{M}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$). Les auteurs ne constatent aucune dégradation abiotique des 2 produits. Le nombre de rotation de la réaction d'hydrolyse du R-VX et VX catalysée par l'OPH est très faible ($0,5\text{s}^{-1}$) comparé à celui de la réaction d'hydrolyse du paraoxon (rupture de la liaison P-O) catalysée par le même enzyme avec un nombre de rotation de 3170s^{-1} .

1-5 Conclusions.

L'analyse bibliographique permet de dégager les points suivants:

- La stabilité chimique et la biodégradabilité des composés organophosphorés varient considérablement d'un composé à un autre, aucune généralité ne peut être tirée.
- Le VX est un composé décrit comme peu stable en conditions abiotiques, seule l'influence du pH sur l'instabilité a été mise en évidence mais d'autres paramètres non identifiés jouent un rôle sur son devenir en conditions abiotiques.
- Le VX est un substrat récalcitrant à la biodégradation, seuls 4 micro-organismes (*Alternaria tenuis*, *Corynebacterium glutamicum*, *Rhodococcus ruber* et *Bacillus sphaericus*) ont été signalés comme éventuellement susceptibles de le dégrader biologiquement. Cette caractéristique est rémanente pour la plupart des COP à liaison P-S décrits comme peu sensibles à l'action des micro-organismes.
- Après rupture de la liaison P-S, les produits de dégradation du VX seraient biodégradables.
- L'organophosphorus hydrolase (OPH) est la seule enzyme décrite comme capable d'hydrolyser la liaison P-S mais la vitesse d'hydrolyse est faible et limite l'utilisation de cette enzyme pour un procédé de décontamination.

CHAPITRE 2 - STABILITE DU VX, DU DEMETON-S-METHYL ET DU TETRISO EN MILIEU ABIOTIQUE.

2-1 Introduction.

Les données bibliographiques relatives au comportement du VX (cf. formule Figure 1; chapitre 1) en milieu abiotique consistent principalement à la description, en fonction du pH, des différentes réactions de dégradation possibles (Epstein *et al.*, 1974; Yang, 1992; Hovanec, 1993) et à la détermination des temps de demi-vie. Les différentes voies de dégradation du VX en fonction du pH sont bien documentées (Cassagne, 1996). En revanche les temps de demi-vie cités dans la littérature sont très disparates, ils varient entre quelques secondes et 100 jours (cf. revue bibliographique) et permettent seulement de constater que la vitesse de dégradation abiotique du VX tend à croître avec l'augmentation du pH et de la température. Cependant d'après Crenshaw *et al.* (1994) d'autres paramètres que la température et le pH interviendraient dans la dégradation chimique du VX. A ce titre Bezeau (1996) indiquait que la dégradation chimique du VX était favorisée par la présence d'oxygène dissous et d'extrait de levure. Les différents éléments minéraux et organiques (sucres, extrait de levure, peptones...) présents dans les milieux de culture microbiologiques pourraient ainsi jouer un rôle non négligeable dans la dégradation abiotique du VX.

La stabilité en milieu abiotique de deux autres COP à liaison P-S proches du VX (tétriso et déméton-S-méthyl - cf. formules Figure 1 au paragraphe 1-1) a été partiellement étudiée. Le tableau 5 reprend leurs propriétés physico-chimiques.

Tableau 5 : Propriétés physico-chimiques de trois COP à liaison P-S.

	VX	Déméton- S-méthyl	Tétriso
Aspect	inodore, incolore	huileux, jaune pâle odeur forte	inodore, jaune
Masse molaire	267,36	230,29	308,5
Densité	1,0143	1,21	ND*
Solubilité (eau)	1 g.L ⁻¹	3,3 g.L ⁻¹	ND*

*Non Déterminé

Le tétriso a déjà été utilisé lors d'études de dégradation biologique comme analogue structural simulant le VX (Cork *et al.*, 1984; Colwell *et al.*, 1989; Hoskin *et al.*, 1995; Kolakowski *et al.*, 1997). Ce produit a été reporté comme abiotiquement stable jusqu'à pH 8,5.

Rastogi *et al.* (1998) indiquaient que le tétriso s'hydrolysait (rupture de la liaison P-S) dans l'eau de façon identique au VX. La constante d'hydrolyse serait de $1,1 \cdot 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ à 23°C (pH non précisé).

Les données bibliographiques relatives à la dégradation abiotique du déméton-S-méthyl et de deux autres COP dérivés (déméton-S-éthyl et déméton-méthyl sulfoxide) sont succinctes. Ziegler *et al.* (1980) signalent que le temps de demi-vie du déméton-méthyl sulfoxide ($C_i = 2\text{mM}$) est de 20 jours dans un milieu de culture stérile à 28°C, 200rpm (valeur du pH non précisée). Les produits de dégradation mis en évidence orientent vers une disparition du déméton-méthyl sulfoxide par rupture de la liaison P-S (hydrolyse). Mauret et Serph (1994) constatent qu'environ 50 % du déméton-S-méthyl ($C_i = 50 \text{ mg.L}^{-1}$) se dégradait en conditions abiotiques (pH 7, 28°C) en 10 jours. Les produits de dégradation n'ont pas été identifiés, il n'a donc pas été permis de conclure si le COP est hydrolysé (rupture de la liaison P-S) ou non. D'après des essais réalisés par Jacquot (1995), la totalité du déméton-S-méthyl ($C_i = 20 \text{ mg.L}^{-1}$) se dégrade chimiquement à pH 10 (25°C) en 72 heures mais il n'est pas précisé si la dégradation observée est due à une rupture de la liaison P-S (hydrolyse). Il ressort de ces résultats que les COP de la famille du déméton présentent comme le VX une tendance à se dégrader en milieu alcalin.

L'objectif du travail développé dans ce chapitre est de compléter les données acquises sur la dégradation abiotique des COP à liaison P-S et de déterminer l'effet des tampons, milieux de culture et différents constituants des milieux de culture utilisés lors des essais biologiques sur la stabilité du VX car il est nécessaire de connaître parfaitement le comportement du VX dans ces milieux avant de débiter l'étude du devenir du VX en présence de micro-organismes.

Pour cela la stabilité du VX a été suivie tout d'abord en milieu BTS, milieu Niven (Montel *et al.*, 1994), milieu minéral nutritif (Hilaire, 1995), milieu Czapek. Les cinétiques de disparition du VX dans ces milieux ont été comparées. Puis les effets :

- des éléments organiques et minéraux de taille inférieure à 1 kD des milieux Niven et BTS ,

- de la concentration de l'extrait de levure, du glucose, du fructose, du phosphate (sous différentes formes),

ont été évalués sur la stabilité chimique du VX.

Enfin le devenir du VX, du déméton-S-méthyl et du tétriso en milieux BTS et minéral nutritif ainsi que l'effet du phosphate sur ces 3 COP ont été comparés pour définir s'il était possible de dégager des analogies sur la dégradation abiotique de ces trois COP et déterminer si le tétriso

ou le déméton-S-méthyl peuvent être utilisés comme analogues structuraux représentatifs du VX.

Lors des essais abiotiques et biologiques effectués dans le cadre de ces travaux, le devenir des trois COP a été suivi par l'une et/ou l'autre des deux méthodes suivantes:

- extraction liquide/liquide et chromatographie phase gazeuse (CPG) qui permet de doser avec précision la quantité réelle de VX dégradé en tenant compte des différentes réactions de dégradation (coupure liaisons P-S, P-O, S-C ...) et de suivre des cinétiques pouvant aller de quelques heures à quelques mois,

- méthode directe d'Ellman permettant de mettre en évidence, par réaction avec le 5,5'-dithio-bis 2-nitrobenzoïque acide (DTNB), la formation du groupement thiol générée par l'hydrolyse du COP à liaison P-S. Cette méthode permet seulement de mettre en évidence la réaction d'hydrolyse de la liaison P-S dont la mesure directe d'hydrolyse s'effectue en continu. La méthode d'Ellman est en principe utilisée pour suivre des réactions d'hydrolyse dont la cinétique est limitée à quelques heures (< 5h). Certains paramètres peuvent entraîner des artefacts, en particulier les protéines présentant des thiols libres qui peuvent interagir avec le DTNB (réactif révélateur des groupements S-H). De ce fait, la méthode n'est pas adaptée au suivi de cinétique de dégradation en présence de micro-organismes.

2-2 **Matériels et méthodes.**

2-2-1 COP

Quatre COP ont été utilisés pour l'étude du comportement abiotique du VX : le VX, le tétriso, le déméton-S-méthyl et le malathion. Ce dernier est employé comme étalon interne pour la CPG.

Le VX a été synthétisé au service Synthèse Chimique du Centre d'Etudes du Bouchet. Sa pureté est de l'ordre de 93%. Le VX pur est conditionné en ampoule de verre scellée (0,8ml environ par ampoule). Une solution mère de VX à 10 g.L^{-1} a été préparée dans de l'isopropanol (prolabo) à partir du VX pur. Cette solution est utilisée pour les essais abiotiques et biologiques.

Le tétriso a été synthétisé au service Synthèse Chimique du Centre d'Etudes du Bouchet. Sa pureté est de l'ordre de 90%. Son mode de préparation pour les essais abiotiques et biologiques est identique à celui du VX.

Le déméton-S-méthyl provient de la société Cluzeau (ref: C121430). Il est fourni en ampoule de 0,1 g. Pour les essais, il a été repris dans de l'isopropanol (Prolabo) pour obtenir une solution mère à 10 g.L^{-1} .

Le malathion a été fourni par la société Cluzeau (ref : C147100) conditionné en ampoule de 0,1 g. Il a été repris dans de l'acétone (prolabo) pour obtenir une solution mère à 1 g.L^{-1} .

2-2-2 Milieux d'essai

Sept milieux de culture et deux solutions tampon ont été utilisés.

a) Milieu bouillon trypticase soja (BTS)

milieu déshydraté (Difco) dont la composition est la suivante (g.L^{-1}) : Bacto tryptone: 17; Bacto soja : 3; Bacto dextrose : 2,5; NaCl : 5; K_2HPO_4 : 2,5.

Le milieu a été stérilisé par autoclavage à 120°C pendant 20 min. Le pH est après stérilisation égal à 7,2.

b) Milieu BTS dialysé

Afin d'évaluer l'action des constituants de petite taille du milieu BTS sur la dégradation abiotique du VX, les éléments minéraux et organiques de taille inférieure à 1 kD ont été éliminés du milieu par dialyse selon le mode opératoire suivant (Harris et Angal, 1989) :

- 110 ml de milieu BTS stérile ont été placés dans un boudin de dialyse (seuil de coupure 1kD) semi-perméable (Spectropor). Le boudin de dialyse a été plongé dans 1L de tampon tris/HCl 20mM pH7,2 pendant 4h à 4°C sous légère agitation. Après 4h de contact, le boudin de dialyse a été plongé dans un nouveau bain de tampon tris/ HCl 20mM pH7,2 (1L) et laissé 1 nuit à 4°C sous légère agitation. Après dialyse le milieu BTS dialysé a été retiré du boudin et a été stérilisé par filtration sur membrane $0,22 \mu\text{m}$ avant utilisation.

c) Milieu minéral

Préparé au laboratoire, la composition de ce milieu était la suivante (g.L^{-1}) : NaNO_3 : 3; MgSO_4 : 0,3; NH_4Cl : 1; CaCl_2 : 0,15.

Les différents sels ont pour origine Prolabo (qualité Normapur).

Le pH a été ajusté à pH 7 avant stérilisation. Le milieu a été stérilisé par autoclavage 20 min à 120°C .

d) Milieu minéral nutritif

Base minérale décrite ci-dessus en c) à laquelle sont ajoutés : fructose (Regain) ou glucose (Merk): 1 à 10 g.L^{-1} ; extrait de levure (Difco) ou peptone (Difco): 0,2 à 10 g.L^{-1} .

e) Milieu minéral nutritif tamponné

Ce milieu a la même composition que le milieu décrit en d) avec ajout d'une solution tampon stérilisée par filtration sur membrane $0,22 \mu\text{m}$. Le pH de cette solution tampon est de 7.

Le tampon a été utilisé pour maintenir le pH à une valeur proche de 7 lors des essais biologiques. Le tampon phosphate ($\text{H}_2\text{KPO}_4/\text{HK}_2\text{PO}_4$) est le tampon principalement utilisé.

f) Milieu de Niven

Ce milieu a été utilisé pour la culture des *Lactobacillus* (Montel *et al.*, 1994). Préparé au laboratoire, sa composition est la suivante (g.L^{-1}) : bactotryptone (Difco) : 5, extrait de levure (Difco) : 5, HK_2PO_4 : 2; L-Arginine : 3, MnSO_4 : 0,05, glucose (Merk) : 0,05.

Les différents sels ont pour origine Prolabo (qualité Normapur).

Le pH est ajusté avant stérilisation. Le milieu a été stérilisé par autoclavage 20 min à 120°C .

g) Milieu de Niven dialysé

Afin d'évaluer l'action des constituants de petite taille du milieu de Niven sur la dégradation abiotique du VX, les éléments minéraux et organiques de taille inférieure à 1 kD ont été éliminés du milieu par dialyse selon le mode opératoire décrit en b) .

h) Milieu Czapek

Ce milieu est utilisé pour la culture de moisissures.

Milieu préparé au laboratoire, sa composition est la suivante (g.L^{-1}) : NaNO_3 : 3; H_2KPO_4 : 0,7; HK_2PO_4 : 0,3; MgSO_4 : 0,5; KCl : 0,5; saccharose (MerK) : 10 g.L^{-1} .

Les différents sels ont pour origine Prolabo (qualité Normapur).

Avant stérilisation, le pH est ajusté à la valeur souhaitée par ajout de HCl 1N ou KOH 1N. Le milieu est stérilisé par autoclavage 20 min à 120°C .

i) Tampon tris/ HCl 20 mM à pH7.

Le tampon tris a été préparé à une concentration de 20 mM, le pH a été ajusté à 7 par ajout de HCl (prolabo) 1N. Le tampon a été stérilisé par autoclavage (120°C pendant 20 min) ou filtration sur membrane d'acétate de cellulose de $0,22 \mu\text{m}$ de porosité.

j) Tampon phosphate $\text{H}_2\text{KPO}_4/\text{HK}_2\text{PO}_4$.

Le tampon a été préparé dans une gamme de concentration comprise entre 50 à 400 g.L^{-1} . Pour obtenir le tampon phosphate à une concentration à N g.L^{-1} , une solution de HK_2PO_4 (Prolabo) à N g.L^{-1} a été préparé ainsi qu'une solution de H_2KPO_4 (Prolabo) à N g.L^{-1} . La solution de H_2KPO_4 a été ajoutée à la solution de HK_2PO_4 jusqu'à obtention d'un pH 7. Le tampon a été ensuite stérilisé par filtration sur membrane d'acétate de cellulose de $0,22 \mu\text{m}$ de porosité. Le tampon a été ajouté aseptiquement dans le milieu de culture avec un rapport de volume de 1:9 (concentration finale de tampon dans le milieu comprise entre 5 et 40 g.L^{-1}).

2-2-3- Dosage des COP à liaison P-S.

2-2-3-1- Dosage par CPG.

Lorsque la méthode de dosage retenue est la CPG, les expérimentations quel que soit le milieu d'essai ont été effectuées en double ou en triple en erlenmeyers en Pyrex de 300 ml

bouché par du coton cardé. Les erlens contiennent 100 ml de milieu réactionnel stérilisé par autoclavage ou par filtration sur membrane 0,22 μm . Le COP est ajouté extemporanément (0,5 ml de solution à 10 g.L^{-1} pour 100 ml de milieu réactionnel) de façon à obtenir une concentration initiale de 0,05 g.L^{-1} . Les erlens ont été ensuite incubés en semi-obscurité à 28 °C, sous agitation 200rpm (incubateur-agitateur Infors) ou à l'obscurité en condition statique à 28°C (étuve). Dans certains cas les essais ont été réalisés en fermenteur 2L (Inceltech) à 28°C avec une agitation de 200rpm. Le volume réactionnel est alors de 0,8 L, la quantité de VX présente dans chaque fermenteur est de 0,04 g. La DL50 étant chez l'homme estimée à 10 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (0,6 mg pour un homme de 60 kg), les essais en fermenteurs - pour des raisons de sécurité - n'ont été effectués que lorsque cela était nécessaire, pour suivre par exemple un paramètre (pH) avec une plus grande précision que ne l'aurait permis des expérimentations en erlen.

2-2-3-1-1 Extraction.

Les extractions ont été effectuées en double pour chaque erlen à partir de 1ml de milieu réactionnel selon la méthode décrite par Hilaire (1995) et Bezeau (1996).

- A 1 ml de milieu réactionnel sont ajoutés 50 μl de malathion à 1 g.L^{-1} puis 1 ml de tris/HCl 100 mM pH 9,2 et 1 ml du mélange hexane (Prolabo)/acétate d'éthyle (Prolabo) dans un rapport de volume de 1:1,

- l'échantillon est ensuite vortexé durant 10 s, traité aux ultrasons à 45 kHz pendant 10 minutes, puis à nouveau vortexé 10 s avant d'être centrifugé 5 min à 2000g à 4°C. La phase solvant est prélevée puis transvasée en tube vial pour CPG.

Les vials peuvent être placés à -80°C pour conservation avant analyse.

2-2-3-1-2- Analyse chromatographique

L'analyse s'effectue avec un chromatographe Hewlett Packart 6890 équipé d'un injecteur automatique en mode split, d'une colonne HP-5MS (crosslinked 5% Ph Me silicone) de longueur 30 m, de diamètre intérieur 0,25 mm, d'épaisseur de film de 0,25 μm et d'un détecteur NPD. Le pilotage de l'appareil, la régulation des différents paramètres, l'acquisition et le traitement des données s'effectuent par l'intermédiaire du logiciel HP-CHEM.

Les paramètres chromatographiques sont les suivants :

- volume injecté : 1 μl ,
- température injecteur : 250°C,

- programmation du four : 80°C (0,5 min) montée à 200°C à 30°C.min⁻¹; palier de 0,5 min à 200°C. Montée à 230°C à 30°C.min⁻¹. Palier de 0,5 min à 230°C. Montée à 290°C à 30°C.min. Palier de 1 min à 290°C.

- gaz vecteur : hélium à débit constant : 1,4 ml.min⁻¹,

- température du détecteur : 280°C,

- gaz vecteurs détecteur : hydrogène (débit 2,6 ml.min⁻¹) et air (60 ml.min⁻¹).

Le taux des COP a été déterminé par rapport à une gamme étalon de 0 à 60 mg.L⁻¹ réalisée dans le même milieu que celui utilisé pour les essais.

Un chromatogramme des trois COP à liaison P-S (Ci = 0,05 g.L⁻¹) est présenté Figure 3.

2-2-3-2- Dosage par la méthode d' Ellman

Quel que soit le milieu réactionnel, les essais ont été conduits en mini-cuves pour spectrophotomètre (trajet optique de 1cm) qui permettent de travailler avec 1ml de milieu réactionnel. Les valeurs de densité optique ont été lues avec un spectrophotomètre (Amersham Pharmacia Ultrospec 3000 ou 4000) thermostaté par effet Peltier à 28°C.

2-2-3-2-1- Essai avec concentration initiale du COP égale à 0,05 g.L⁻¹

Dans une première mini-cuve pour spectrophotomètre (appelée cuve essai), 0,985 ml de la solution à tester est versée puis 0,01 ml de DTNB à 10 mM est ajouté. La cuve est incubée 15 min à l'obscurité à 28°C. Après incubation, 0,005 ml de COP à 10 g.L⁻¹ est additionné. Après l'addition du COP, le milieu réactionnel est homogénéisé puis la cuve est placée sur le passeur d' échantillon du spectrophotomètre thermostaté à 28°C. La DO est mesurée rapidement à 412 nm pour obtenir le temps T₀, Des mesures de DO sont ensuite effectuées aux intervalles de temps souhaités. Le graphe f(temps) = DO est tracé et permet de déterminer la vitesse (V_i en unités DO.h⁻¹) de formation du TNB en présence du COP.

Dans une deuxième cuve (appelée cuve témoin réduction spontanée du DTNB), 0,99 ml de la solution à tester est versé, 0,01 ml de DTNB à 10 mM est ajouté. Le mélange est incubé 15 min à l' obscurité 28°C. Après incubation, il est nécessaire d'homogénéiser le milieu réactionnel avant de placer la cuve sur le passeur d'échantillon du spectrophotomètre thermostaté à 28°C. Lorsque la cuve est en place, la DO est mesurée à 412 nm (temps T₀) puis aux intervalles de temps souhaités. Avant chaque nouvelle mesure de DO, il convient de

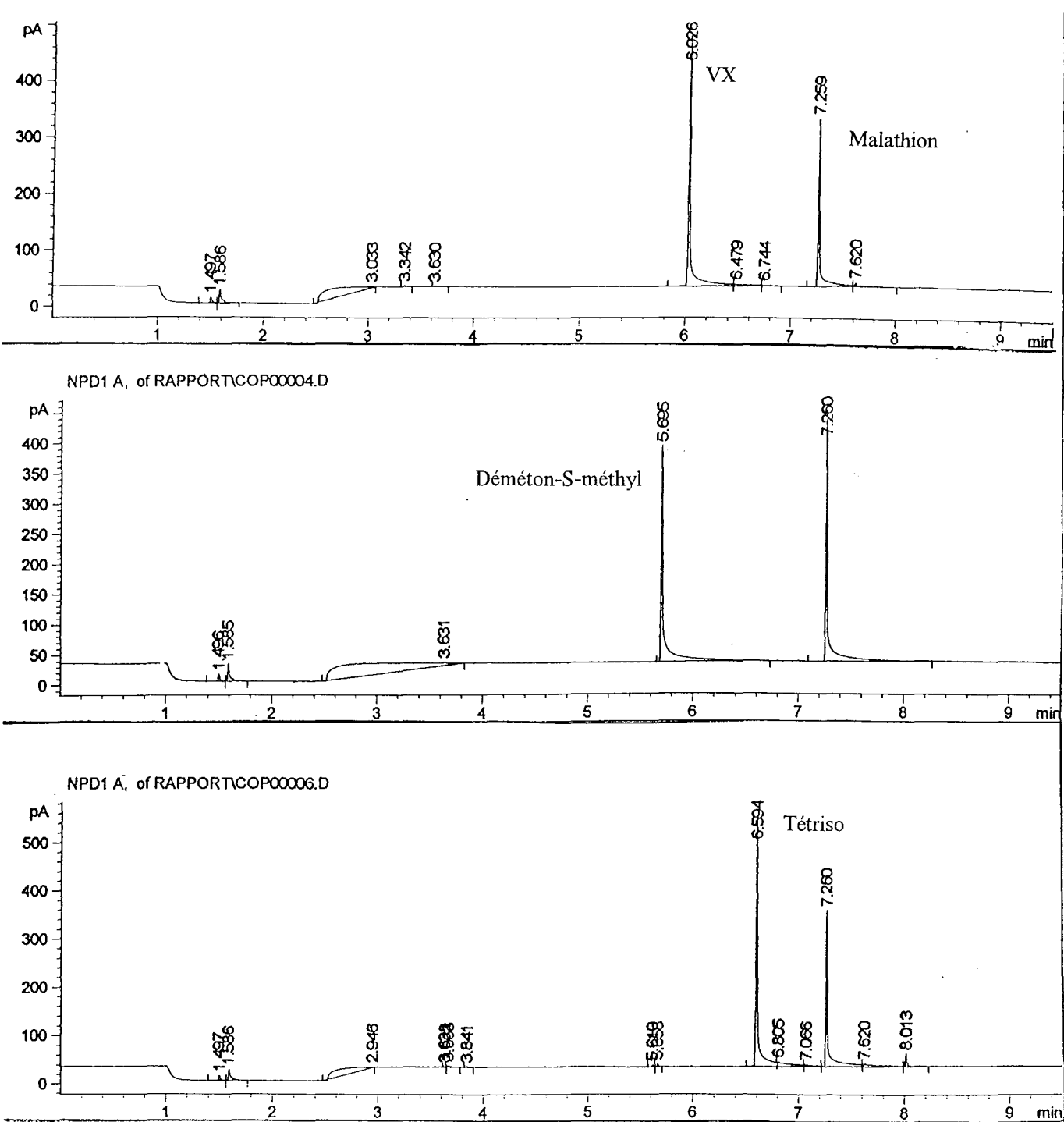


Figure 3 : Chromatogrammes du VX (temps de rétention 6.026 min), du tétriso (temps de rétention 6.594 min), du déméton-S-méthyl (5.695) et malathion (temps de rétention 5.695 min).

mélanger le milieu. A la fin de l'essai, le graphe $f(\text{temps}) = \text{DO}$ permet de déterminer la vitesse initiale de formation du TNB en absence du COP (V_i en unités $\text{DO} \cdot \text{h}^{-1}$). La V_i de formation du TNB due à l'hydrolyse du VX est égale à :

$$V_i (\text{DO} \cdot \text{h}^{-1}) = V_i \text{ cuve essai} - V_i \text{ cuve témoin réduction du DTNB.}$$

La loi de Beer-Lambert permet de calculer la V_i en M de TNB formé par heure en utilisant la relation suivante :

$$\Delta \text{DO} = \sum \Delta \text{CL} \Rightarrow \Delta \text{C} = \Delta \text{DO} / \sum \text{L}$$

avec $\sum \text{DTNB} = 13600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Hoskin *et al.* 1995; Lai *et al.*, 1995) à 412 nm et L (trajet optique) = 1 cm d'où $V_i = \Delta \text{DO} \cdot \text{h}^{-1} / 13600 = \Delta \text{C} \cdot \text{h}^{-1}$.

La vitesse d'hydrolyse du COP est égale à la vitesse de formation du TNB.

2-2-3-2-2 Essai avec concentration initiale du COP égale à $0,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$

Le mode opératoire est le même que celui décrit précédemment mais la prise d'essai de la solution à tester est de 0,94 ml. La quantité de VX ($10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) ajoutée est de 50 μl .

2-2-4 Analyse RMN

Pour déterminer les sites d'attaque des 3 COP à liaison P-S lors des essais abiotiques et biologiques, la RMN du phosphore (^{31}P RMN) est utilisée. Les essais ^{31}P RMN ont été effectués au laboratoire de Chimie analytique du CEB à 25°C, 145,7 MHz sur des prises d'essai de 550 μl (500 μl d'échantillon + 50 μl de D_2O) avec un spectrophotomètre Bruker Avance DPX 360 équipé d'une sonde quadripôle.

2-3 Résultats expérimentaux.

2-3-1 Comparaison de la stabilité chimique du VX dans les milieux BTS, Niven, minéral nutritif tamponné, Czapek et tampon tris/HCl 20 mM.

L'objectif de ces expérimentations est de comparer la stabilité du VX dans différents milieux de culture et en tampon tris/HCl, ce dernier est utilisé lors de la préparation d'extraits intra cellulaires, et lors de purifications d'enzymes. Ces comparaisons s'effectuent aux même pH et température.

2-3-1-1 Protocole.

Le devenir du VX ($C_i = 0,05 \text{ g.L}^{-1}$) dans les différents milieux réactionnels a été déterminé à 28°C, pH 7, à l'obscurité et avec une agitation de 200 rpm. Le taux de VX a été suivi en fonction du temps par CPG. Chaque essai a été effectué en double et pour chaque duplicat l'analyse CPG (extraction) a été réalisée en 2 exemplaires.

2-3-1-2 Résultats.

Le devenir du VX varie selon les milieux réactionnels (Figure 4 et Tableau 6). La quantité de VX dégradé après 48 heures d'expérimentation est de l'ordre de 10% de la concentration initiale dans les milieux : Tris/HCl, Czapek, nutritif. Elle s'échelonne de 30 à 70 % dans les milieux : BTS, nutritif et Niven. Les vitesses de disparition du VX, selon les milieux, oscillent entre 0,3 et 6,3 $\mu\text{M.h}^{-1}$, les temps de demi-vie apparents se situent entre 25 et 625 heures. A pH et températures identiques, la stabilité chimique du VX est variable selon le milieu réactionnel, la dégradation abiotique du VX est influencée par des paramètres autres que le pH tel la nature chimique du milieu réactionnel.

2-3-2 Recherche de l'influence des constituants de taille inférieure à 1 kD des milieux Niven et BTS sur la stabilité chimique du VX.

Le VX étant instable dans les milieux BTS et Niven, nous avons souhaité rechercher le rôle éventuel des constituants minéraux ou organiques de petite taille de ces deux milieux sur la dégradation chimique du VX. Nous avons pour cela dialysé les milieux BTS et Niven de façon à éliminer du milieu les constituants minéraux et organiques de taille inférieure à 1 kD.

2-3-2-1 Protocole.

Le devenir du VX ($C_i = 0,05 \text{ g.L}^{-1}$) à 28°C pH 7, 200 rpm a été déterminé par CPG dans les milieux BTS et Niven dialysés. Chaque essai a été effectué en double et pour chaque duplicate, l'analyse CPG (extraction) a été réalisée en 2 exemplaires.

2-3-2-2 Résultats.

En présence de conditions opératoires identiques (pH, température, agitation), le VX reste stable (durée de demi-vie de l'ordre de 800 heures) dans les milieux BTS et Niven dialysés sur 1kD alors qu'il est dégradé dans les milieux natifs (Figure 5). Des constituants

minéraux et/ou organiques de taille inférieure à 1 kD sont responsables de la dégradation chimique du VX dans ces milieux réactionnels.

Tableau 6 : Caractéristiques des réactions de disparition du VX ($C_i = 0.05 \text{ g.L}^{-1}$) en fonction du milieu réactionnel, à pH7, 28°C et 200rpm.

Milieu réactionnel	Vitesse* de disparition du VX ($\mu\text{M.h}^{-1}$)	Ecart type ($\mu\text{M.h}^{-1}$)	Temps de demi-vie (h^{-1})
Tris/HCl	0,3	0,02	625
Czapek	0,45	0,03	416
BTS	1,17	0,07	160
Minéral nutritif	1,95	0,12	48
Niven	6,3	0,3	25

* Vitesses calculées sur 4 valeurs sur les 8 premières heures d'expérimentation

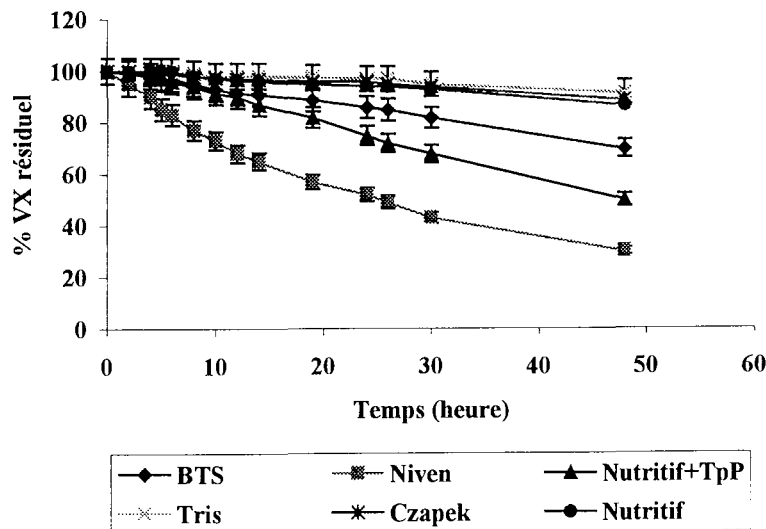


Figure 4 : Disparition du VX ($C_i = 0,05 \text{ g.L}^{-1}$) en conditions abiotiques en milieux BTS, Niven, minéral nutritif tamponné, Czapek et tampon tris/HCl 20 mM à pH 7, 28°C, 200rpm. Détermination par CPG. Moyenne calculée sur 4 valeurs.

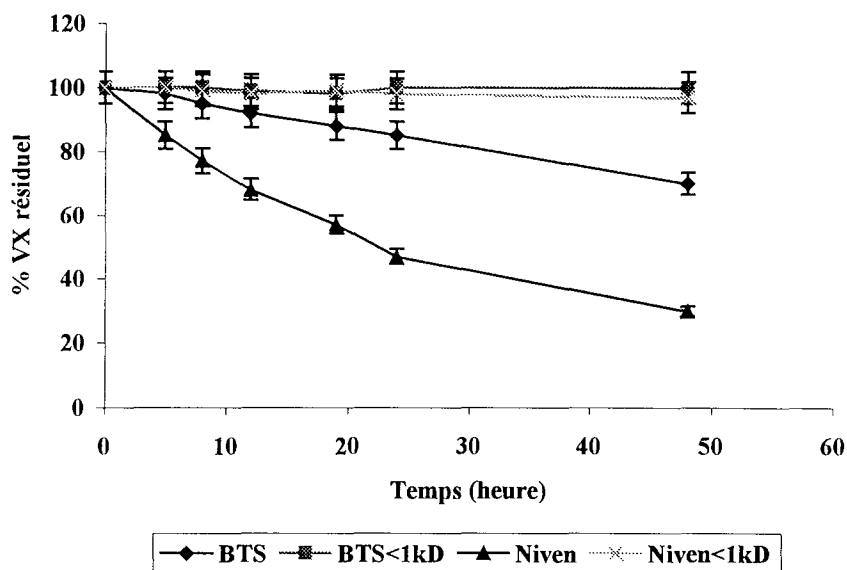


Figure 5 : Disparition du VX ($C_i = 0,05 \text{ g.L}^{-1}$) en conditions abiotiques en milieux BTS et Niven natifs et dialysés contre 1 kD à pH 7, 28°C, 200rpm. Détermination par CPG. Moyenne calculée sur 4 valeurs.

2-3-3 Effets de l'extrait de levure, sucres et tampon phosphate sur le devenir du VX en conditions abiotiques.

2-3-3-1 Protocole.

Le rôle de l'extrait de levure, du sucre et du tampon phosphate sur la stabilité chimique du VX a été recherché en milieu minéral nutritif. Pour cela, le devenir du VX a été suivi par CPG dans le milieu minéral nutritif avec des concentrations variables d'extrait de levure (0 à 10 g.L^{-1}), de glucose ou fructose (0 à 10 g.L^{-1}), de tampon phosphate (0 à 20 g.L^{-1}).

Les paramètres suivants sont communs à chaque essai :

- concentration initiale de VX = 0,05 g.L^{-1} ,
- pH = 7,
- température = 28°C,
- agitation 200 rpm.

2-3-3-2 Résultats.

Les vitesses de disparition du VX en fonction des concentrations d'extrait de levure, fructose, glucose et tampon phosphate sont présentées tableau 7. L'extrait de levure, le glucose et le fructose aux concentrations testées n'entraînent aucun effet sur les vitesses de disparition chimique du VX, seule l'augmentation de la concentration en tampon phosphate entraîne un accroissement de la vitesse de disparition du VX. Le tampon phosphate apparaît comme l'élément responsable de la dégradation abiotique du VX en milieu minéral nutritif.

2-3-4 Recherche des produits de dégradation abiotique du VX en milieu minéral nutritif (extrait de levure 5 g.L⁻¹, glucose 5 g.L⁻¹ et tampon phosphate 15 g.L⁻¹).

L'objectif est d'identifier les produits de dégradation du VX pour déterminer la voie de dégradation du VX par le tampon phosphate en milieu minéral nutritif.

2-3-4-1 Protocole.

Après exposition du VX ($C_i = 0.05 \text{ g.L}^{-1}$) en milieu minéral nutritif (pH 7.2 et 28°C), les produits de dégradation ont été recherchés par CPG et ³¹P RMN conformément aux méthodes décrites au paragraphe 2-2 Matériels et méthodes.

2-3-4-2 Résultats.

L'analyse CPG (Figure 6) permet la mise en évidence du DPAT (diisopropylaminoéthanthiol) dont le temps de rétention est égal à 7.676 min. La ³¹P RMN (Figure 7) effectuée, après 24 heures d'incubation du VX en milieu minéral nutritif avec 15 g.L⁻¹ de tampon phosphate, identifie la présence d'un produit de déplacement chimique de 21.17 ppm identifié comme étant l'EMPA (acide éthyl méthylphosphonique). Le DPAT et l'EMPA, dont les formules développées sont présentées Chapitre 1 Figure 2, sont générés par la rupture de la liaison P-S du VX. La présence de tampon phosphate induit l'hydrolyse du VX.

2-3-5 Effets de la nature du phosphate sur le devenir du VX en conditions abiotiques.

Le tampon phosphate étant un paramètre qui favorise la disparition chimique du VX, nous avons souhaité évaluer quelle influence pouvait exercer sa forme (K_2HPO_4 ; KH_2PO_4 ;

K₂HPO₄/ KH₂PO₄; Na₂KPO₄; NaK₂PO₄; Na₂HPO₄/ NaH₂PO₄) sur la dégradation abiotique du COP.

2-3-5-1 Protocole.

Les vitesses d'hydrolyse du VX (C_i = 0,5 g.L⁻¹) ont été mesurées par la méthode d'Ellman à pH 7 et 8 à 28°C dans les solutions de phosphate (concentration 20 g.L⁻¹) suivantes: - K₂HPO₄, - KH₂PO₄, - K₂HPO₄/ KH₂PO₄, - Na₂KPO₄, - NaK₂PO₄, - Na₂HPO₄/ NaH₂PO₄ préparées par ajout des sels dans de l'eau osmosée. Le pH a été ajusté à 7 ou 8 lorsque cela était nécessaire par addition de HCL (5N) ou KOH (5N).

Tableau 7 : Vitesses (μM.h⁻¹) de disparition du VX (C_i = 0.05 g.L⁻¹) en conditions abiotiques à 28°C, pH7, 200rpm en fonction de la concentration en extrait de levure (YE), glucose (G), Fructose (F) et tampon phosphate (TpP).

Concentration (g .L ⁻¹)	Vitesses (μM.h ⁻¹) de disparition du VX	Ecart type* (μM.h ⁻¹)
YE 0, G 5, TpP 15	2.6	0.07
YE 0.2, G 5, TpP 15	2.6	0.07
YE 1, G 5, TpP 15	2.8	0.07
YE 5, G 5, TpP 15	2.5	0.06
YE 10, G 5, TpP 15	2.8	0.1
YE 5, G 0, TpP 15	2.4	0.09
YE 5, G 1, TpP 15	2.4	0.08
YE 5, G 5, TpP 15	2.5	0.09
YE 5, G 10 TpP 15	2.7	0.08
YE 5, F 0 TpP 15	2.4	0.06
YE 5, F 1 TpP 15	2.3	0.09
YE 5, F 5 TpP 15	2.4	0.08
YE 5, F 10 TpP 15	2.3	0.07
YE 5, G 5 TpP 0	0.55	0.02
YE 5, G 5 TpP 5	1.2	0.06
YE 5, G 5 TpP 15	2.5	0.08
YE 5, G 5 TpP 20	3.4	0.1

* calculés sur 4 valeurs

2-3-5-2 Résultats.

La méthode d'Ellman (formation de TNB en présence de VX et phosphate) confirme bien que le phosphate entraîne une hydrolyse (rupture de la liaison P-S) du VX. La vitesse d'hydrolyse du VX est influencée par la forme du phosphate, les formes liées au potassium étant celles qui entraînent la plus grande vitesse d'hydrolyse (Tableau 8). Ce phénomène est observé que ce soit à pH 7 ou 8. A pH 8 la vitesse d'hydrolyse est deux fois plus importante qu'à pH 7, le caractère pH dépendant de la dégradation chimique est toujours observé en présence de tampon phosphate.

Tableau 8 : Vitesses d'hydrolyse $\mu\text{M}\cdot\text{h}^{-1}$ (mesurées par la méthode d' Ellman) du VX ($C_i = 0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) en milieu aqueux (eau osmosée) plus K_2HPO_4 ($20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) ou KH_2PO_4 ($20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) ou $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ ($20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) ou $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ($20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) ou Na_2KPO_4 ($20\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) ou NaK_2PO_4 ($20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) à pH 7 et 8, à 28°C en condition statique.

pH	K_2HPO_4	KH_2PO_4	$\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$	Na_2HPO_4	NaH_2PO_4	$\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$
7	37	50	48	24	42	33
8	91	82	97	51	71	61

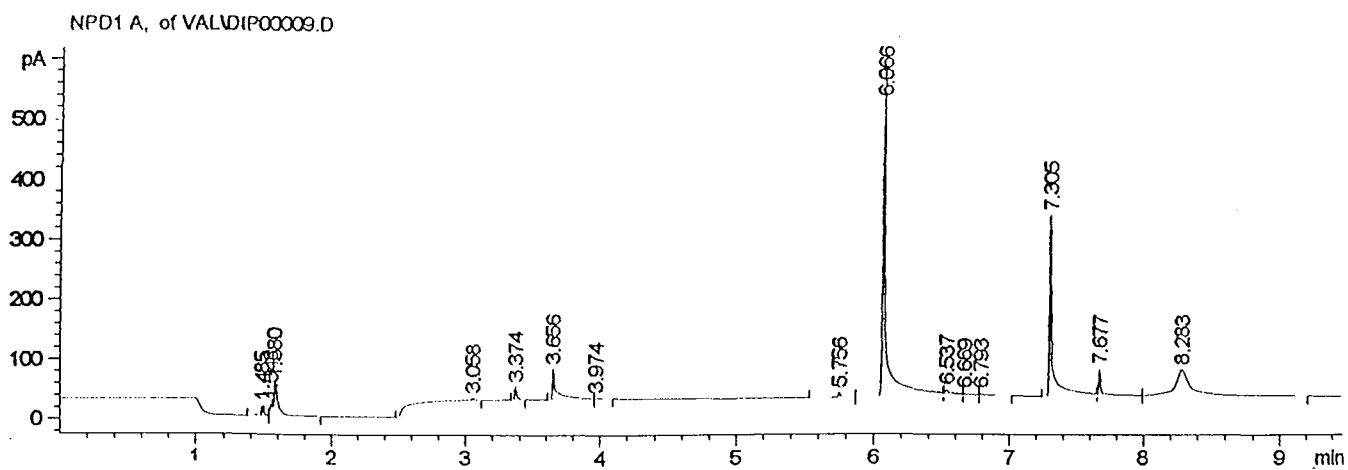
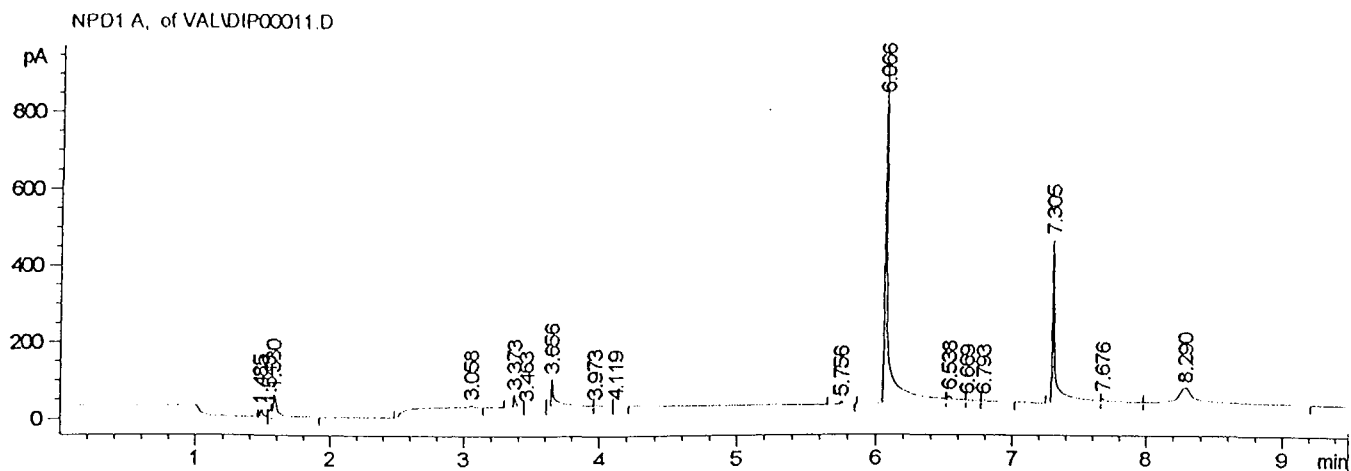


Figure 6 : Chromatogrammes du milieu minéral nutritif ($\text{CiVX} = 0.05 \text{ g.L}^{-1}$) avant et après incubation 6 heures à 28°C , à pH7. Temps de rétention du VX = 6.0667min. Temps de rétention du DPAT = 7.676 min.

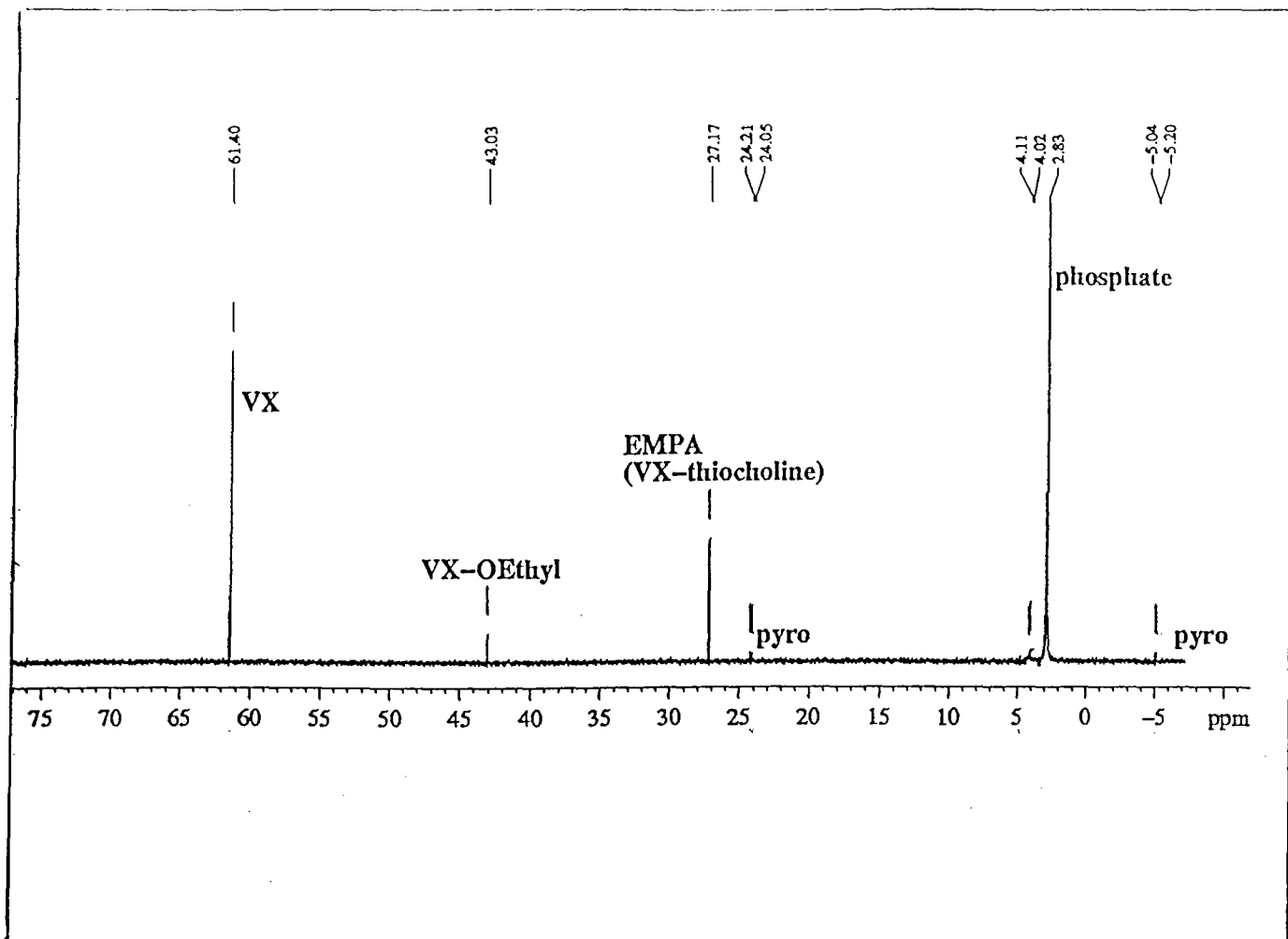


Figure 7 : Spectre ^{31}P RMN du milieu minéral nutritif ($\text{Ci VX} = 0.05 \text{ g.L}^{-1}$) après incubation 6 heures à 28°C , à pH7.

2-3-6 Comparaison de la stabilité chimique du VX, déméton-S-méthyl et tétriso en milieux BTS, minéral nutritif et tampon phosphate 20 g.L⁻¹.

Cette comparaison a pour objet de déterminer si le déméton-S-méthyl et le tétriso ont le même comportement abiotique que le VX.

2-3-6-1 Protocole.

Le devenir des 3 COP ($C_i = 0,05 \text{ g.L}^{-1}$) a été déterminé par CPG dans les milieux BTS et minéral nutritif à pH7, 28°C et 200rpm. Le devenir des 3 COP ($C_i = 0,5 \text{ g.L}^{-1}$) en tampon phosphate (20 g.L⁻¹) a été suivi par la méthode d'Ellman (pH8, 28°C).

2-3-6-2 Résultats.

Le déméton-S-méthyl est stable dans les milieux BTS et minéral nutritif (Figure 8), le VX et le tétriso sont dégradés dans ces deux milieux selon une cinétique d'ordre 0 (Figure 8). Les vitesses de disparition du VX sont égales à 1,1 $\mu\text{M.h}^{-1}$ en milieu BTS et 2,3 $\mu\text{M.h}^{-1}$ en milieu minéral nutritif, celles du tétriso sont égales à 0,5 $\mu\text{M.h}^{-1}$ en milieu BTS et 1 $\mu\text{M.h}^{-1}$ en milieu minéral nutritif. Les vitesses les plus grandes sont obtenues dans le milieu qui renferme le plus de phosphate.

Les vitesses de disparition des trois COP en tampon phosphate 20 g.L⁻¹ font l'objet du tableau 8. Le tampon phosphate occasionne une hydrolyse (rupture de la liaison P-S) des 3 COP mais le VX est celui qui présente la vitesse d'hydrolyse la plus forte, le déméton-S-méthyl a la vitesse d'hydrolyse la plus faible, le tétriso a un comportement intermédiaire ; il est beaucoup moins sensible que le VX à l'effet du tampon phosphate.

Tableau 8 : Détermination de la vitesse d'hydrolyse du VX, déméton S-méthyl et tétriso ($C_i = 0,5 \text{ g.L}^{-1}$) en tampon phosphate 20 g.L⁻¹, à pH 8, 28°C en condition statique.

	VX	déméton S-méthyl	tétriso
Vitesse $\mu\text{M.h}^{-1}$	90	5	20

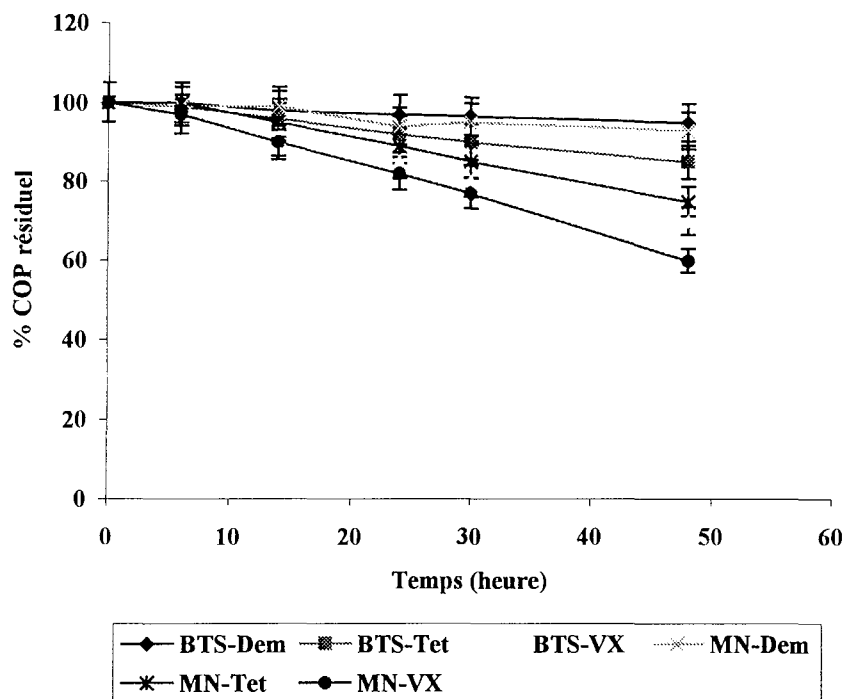


Figure 8: Disparition du VX, déméton-s-méthyl (Dem) et tétriso (Tet) en conditions abiotiques en milieux BTS et minéral nutritif (MN) en fonction du temps à 28°C, pH7 et 200rpm. Ci = 0,05 g.L⁻¹. Détermination par CPG. Moyenne calculée sur 4 valeurs.

2-4 Discussion.

2-4-1 Dégradation abiotique du VX.

Le VX est apparu instable dans les milieux réactionnels testés, excepté lorsque les milieux sont dépourvus des éléments organiques et/ou minéraux de taille inférieure à 1 kD. Les temps de demi-vie du VX obtenus expérimentalement fluctuent entre 25 et 800 heures (pH 7 et 28°). Le pH n'est pas le seul paramètre responsable de la dégradation chimique du VX, ce qui confirme les observations effectuées par Crenshaw *et al.*(1994). Des substances minérales ou organiques de petite taille sont impliquées dans la dégradation chimique du VX.

L'étude du rôle de l'extrait de levure, glucose, fructose et phosphate, sur la stabilité du VX, a montré que :

-l'extrait de levure (jusqu'à 10 g.L⁻¹) ne présente aucun impact sur la dégradation chimique du VX contrairement à ce que Bezeau (1996) avait suggéré,

-le fructose ou le glucose jusqu'à 10 g.L^{-1} ne facilitent pas la disparition abiotique du VX,

-la présence de phosphate a pour incidence d'augmenter la vitesse de disparition du VX.

Il est apparu que la vitesse de dégradation abiotique du VX augmente avec la concentration de phosphate du milieu d'essai. La forme du phosphate lié au potassium est celle qui occasionne la vitesse de disparition la plus rapide. L'effet du phosphate s'ajoute à celui du pH, car la vitesse de dégradation du VX pour une même concentration de phosphate est toujours plus rapide à pH 7 que 8. Les analyses chimiques effectuées par CPG et ^{31}P RMN permettent de mettre en évidence la formation de DPAT et d'EMPA. Ces deux produits sont formés lors de la rupture de la liaison P-S du VX (Cassagne, 1996). La méthode d'Ellman confirme la rupture de la liaison P-S du VX en présence de phosphate. L'action du phosphate sur la dégradation abiotique du VX n'a jamais été citée dans la littérature, seule l'action des ions Cu^{2+} sur la disparition chimique du VX décrite par Yang *et al.* (1992) ayant été signalée. Cependant Moriya *et al.* (1999) ont indiqué l'action possible du phosphate sur la dégradation du chlorpyrifos-méthyl qui est un organophosphorothioate. Les mêmes auteurs notent que le fluorure de sodium favorise la dégradation chimique de deux composés organophosphorés chlorpyrifos-méthyl et du dichlorvos (organophosphate).

Le mécanisme d'action du phosphate sur le VX n'est pas connu mais il se pourrait que le phosphate à des pH inférieurs à 8,7 (pK_a du VX = 8,8) se fixe sur l'atome d'azote du VX qui est chargé positivement et fragilise la liaison P-S vis-à-vis des ions OH^- , d'où une accélération de la vitesse d'hydrolyse (Devaux, 1999).

2-4-2 Comparaison de la stabilité abiotique du VX, du déméton-S-méthyl et du tétriso.

Le déméton-S-méthyl est apparu stable en milieux minéral nutritif et BTS. Girbal *et al.* (1998) signalaient la stabilité de ce COP, à pH7, en milieu minéral décrit par Dominguez *et al.* (1993) cependant Jorand *et al.* (1997) observaient une instabilité du COP dans ce même milieu. Quoi qu'il en soit, force est de constater que le déméton-S-méthyl est beaucoup plus stable que le VX dans les milieux BTS et minéral nutritif. Le phosphate ne semble pas présenter d'effet très marqué sur la dégradation chimique du déméton-S-méthyl contrairement au VX.

Concernant le tétriso, l'instabilité de ce composé est moindre que celle du VX. En présence de phosphate les vitesses de dégradation du tétriso et VX augmentent mais avec une intensité

moindre pour le tétriso que pour le VX. La méthode d'Ellman montre que le phosphate entraîne une hydrolyse du tétriso (rupture de la liaison P-S).

Le tableau 9 tenant compte des données bibliographiques et des résultats obtenus lors de cette étude résume l'effet de différents paramètres sur la stabilité chimique du VX, du déméton-S-méthyl et du tétriso.

Tableau 9 : Comparaison de la stabilité du VX, déméton-S-méthyl, tétriso en conditions abiotiques.

	VX	Déméton S-méthyl	Tétriso
Sensibilité au pH	augmentation à partir de 7,7	augmentation à partir de 8 ⁽¹⁾⁽³⁾	Augmentation à partir de 8 ⁽²⁾
Sensibilité à l'oxygène	+/-	non ⁽²⁾	non ⁽²⁾
Stabilité en milieux BTS et minéral nutritif	non (++)	oui	non (+)
Sensibilité aux sucres	non	non	ND ⁽³⁾
Sensibilité à l'extrait de levure	non	non	non
Sensibilité au phosphate	oui (++)	non	oui (+)

(1) Jorand *et al.*(1997)

(2) Girbal *et al.*(1998)

(3) Jorand *et al.* (1999)

(4) Non Déterminé.

2-5 Conclusions

En conclusion de ce chapitre, en fonction des conditions opératoires utilisées il apparaît que le VX est moins stable chimiquement que le tétriso et le déméton-S-méthyl. Les temps de demi-vie du VX sont très variables, pour le même pH, ils fluctuent entre 25 et 625 heures, ils sont dépendants du milieu réactionnel. Des éléments de taille inférieure à 1 kD favorisent la dégradation du VX. Parmi ces éléments, le rôle du phosphate est prépondérant car il entraîne une hydrolyse du VX (rupture de la liaison P-S) ; cet élément est à prendre en compte lors des essais biologiques. Le rôle du phosphate est aussi observé sur la dégradation chimique du tétriso. Par contre le déméton-S-méthyl ne semble pas être un bon modèle du VX pour l'étude du comportement abiotique de ce dernier car il est stable dans les différents milieux réactionnels testés contrairement au VX. Le tétriso, comme modèle du VX, paraît mieux adapté que le déméton-S-méthyl, mais avec des réserves car malgré des analogies structurales très marquées, il semble beaucoup plus stable que le VX.

CHAPITRE 3 - ETUDE DU COMPORTEMENT DU VX, DU DEMETON-S-METHYL ET DU TETRISO EN PRESENCE DE MICRO-ORGANISMES EN CULTURE PURE.

3-1 Introduction

La biodégradabilité du VX, du déméton-S-méthyl et du tétriso n'a jamais été réellement mise en évidence, la liaison P-S de ces composés étant décrite comme très résistante à l'hydrolyse enzymatique (Hoskin *et al.*, 1995).

La revue de la littérature montre que l'étude de la dégradation du VX par voie biologique a été abordée selon deux approches, à savoir :

-par criblage d'enzymes ou d'extraits protéiques d'origine eucaryote ou procaryote (Defrank, 1991), la majorité des travaux effectués consistant au criblage de protéines présentant des activités hydrolytiques vis à vis des agents G ou de pesticides COP. Parmi les très nombreuses protéines testées (Hoskin et Walker, 1997), seule l'enzyme OPH a été décrite comme susceptible d'hydrolyser le VX (Rastogi *et al.*, 1997).

-par screening de micro-organismes, technique dont l'utilisation a été plus limitée que l'emploi d'extraits protéiques. Seuls Colwell *et al.* (1989), Hilaire (1995) et Bezeau (1996) ont testé la capacité de micro-organismes en culture à biodégrader le VX. La démarche a consisté à utiliser des inocula mixtes provenant de l'environnement (boues activées, sédiments...), le but étant de sélectionner un ou plusieurs micro-organismes aptes à dégrader le VX. Cependant les résultats obtenus n'ont pas été convaincants. Hilaire (1995) et Bezeau (1996) ont proposé l'alternative d'utiliser des souches pures de collection, décrites pour leur capacité à dégrader des COP. Les travaux de Bezeau (1996) et Hilaire (1995) ont ainsi permis de sélectionner trois bactéries : *Corynebacterium glutamicum*, *Bacillus sphaericus*, *Rhodococcus opacus* et une moisissure : *Alternaria tenuis* qui paraissent posséder un potentiel à dégrader le VX mais pas totalement démontré. Les auteurs indiquent que le VX n'est pas utilisé comme source de carbone et d'énergie par les quatre micro-organismes mais qu'il serait dégradé seulement en présence d'une source de

carbone et d'énergie complémentaire. Néanmoins les résultats obtenus ne sont pas totalement satisfaisants car les quantités de VX dégradées restent limitées et une origine abiotique de la dégradation du VX n'a pu être totalement exclue.

Concernant le déméton-S-méthyl, Jorand *et al.* (1997) ainsi que Girbal *et al.* (1998) ont constaté que *Corynebacterium glutamicum* et *Rhodococcus opacus* n'étaient pas capables de se développer en sa présence comme unique source de carbone et d'énergie. Par contre, Girbal *et al.* (1999) indiquent que ce COP est dégradé par *Corynebacterium glutamicum* seulement en présence d'une source complémentaire de carbone (fructose) capable de supporter la croissance de la bactérie.

L'objectif du travail présenté dans ce chapitre est :

- d'identifier une souche capable de biodégrader* le VX,
- d'évaluer l'effet de certains constituants des milieux de culture sur la biodégradation du VX par *Corynebacterium glutamicum*,
- de déterminer si *Corynebacterium glutamicum* est capable de biodégrader le tétriso et le déméton-S-méthyl,
- de déterminer si *Corynebacterium glutamicum* dégrade le VX par rupture de la liaison P-S, en vue de purifier ultérieurement une enzyme capable d'hydrolyser le VX

Pour cela les étapes suivantes ont été suivies :

- comparaison de la capacité de 7 souches : *Corynebacterium glutamicum*, *Rhodococcus opacus*, *Bacillus sphaericus*, *Alternaria tenuis*, *Corynebacterium petrophilum*, *Trichoderma viride*, *Lactobacillus sake*, à biodégrader le VX,

* Nous parlerons de biodégradation ou de dégradation biologique du VX lorsque sa vitesse de dégradation en présence d'un micro-organisme est supérieure à sa vitesse de dégradation en conditions abiotiques mesurée aux mêmes pH et température.

-détermination de l'effet de l'extrait de levure, des peptones, des sucres (fructose et glucose), du taux de croissance, de la biomasse, du tampon phosphate sur la biodégradation VX à partir par *Corynebacterium glutamicum*,

-recherche de la capacité de *Corynebacterium glutamicum* à dégrader biologiquement le déméton-S-méthyl et le tétriso.

-identification du ou des produits de dégradation biologique du VX et du déméton-S-méthyl,

-mise en évidence de la dégradation biologique du diisopropylaminoéthanol (produit d'hydrolyse du VX) par *Corynebacterium glutamicum*.

-détermination de l'effet des paramètres favorisant la dégradation biologique du VX par *Corynebacterium glutamicum* sur *Corynebacterium petrophilum*.

3-2 **Matériels et méthodes.**

3-2-1 Composée organophosphorés

Les trois COP sont utilisés comme indiqué au paragraphe 2-2-1.

3-2-2 Micro-organismes d'essai et milieux d'essai.

Le Tableau 10 indique l'origine des micro-organismes d'essai et les milieux de culture utilisés dont la composition est donnée chapitre 2 – Matériels et méthodes (cf. paragraphe 2-2-2).

Les différentes souches bactériennes sont conservées en tube plastique de type Munch (conditionnement 1 ml) à -80°C, en présence de glycérol (10 à 30%) comme agent cryoprotecteur (sauf pour *Corynebacterium glutamicum*). Les moisissures *Alternaria tenuis* et *Trichoderma viride* sont conservées à 4°C sur gélose inclinée (malt : 20g.L⁻¹, gélose : 20g.L⁻¹).

Tableau 10 : Liste des micro-organismes d'essai et milieux de culture.

Souche	Référence CEB	Référence collection	Milieux d'essai
<i>Bacillus sphaericus</i>	94/06	ATCC 12300 (EU)	BTS Milieu minéral nutritif
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	94/04	ATCC 13745 (EU)	BTS Milieu minéral nutritif
<i>Corynebacterium petrophilum</i>	94/03	ATCC 19080 (EU)	BTS Milieu minéral nutritif
<i>Lactobacillus sake</i>	95/60	L111 (INRA)	Niven
<i>Rhodococcus opacus</i>	94/02	DSM 43252 (A)	BTS Milieu minéral nutritif
<i>Alternaria tenuis</i>	95/01	Baarn (PB)	Czapek
<i>Trichoderma viride</i>	95/23	ATCC 9645 (EU)	Czapek

3-2-3 Essais en erlen

Pour les souches bactériennes, un aliquote (1 ml) de la souche à tester est décongelé. Il sert àensemencer 100 ml de milieu BTS (ou Niven pour *Lactobacillus sake*) contenu dans un erlen en verre de 250 ou 300 ml bouché avec du coton cardé. L'erlen est mis à incuber entre 14 et 18 h à 28°C et 200rpm. Après incubation, la pré-culture (environ 50 ml) est centrifugée à 10000g pendant 10 minutes. Le surnageant est rejeté, le culot est repris dans du milieu d'essai (BTS, milieu minéral nutritif ou Niven) dans un volume d'environ 20 ml pour former l'inoculum. Le milieu d'essai estensemencé par l'inoculum pour obtenir une DO à 600 nm comprise entre 0,3 et 0,5 (volume réactionnel final : 100 ml dans un erlen de 250 ou 300 ml). Après ensemencement, le

pH est mesuré, 500 μ l de VX à 10 g.L⁻¹ sont ajoutés puis le milieu est incubé à l'obscurité à 28°C et 200 rpm.

Dans le cas des moisissures, l'inoculum est préparé conformément à la norme NF X 41-514 ; à savoir : 8 à 10 ml de milieu Czapek stérile sont versés dans le tube de gélose inclinée contenant la moisissure, la surface du mycélium est grattée avec une oese en platine stérile pour détacher les spores. La suspension de spores obtenue est filtrée sur une gaze stérile, puis transvasée dans du milieu Czapek (volume final 100 ml dans un erlen de 250 ou 300 ml). Après ensemencement le pH est mesuré, 500 μ l de VX à 10 g.L⁻¹ sont ajoutés puis le milieu est incubé à 28°C et 200 rpm.

Les cinétiques des paramètres pH, croissance bactérienne et taux de COP ont été mesurés en suivant les modes opératoires ci-dessous :

Lorsque les erlens ne renferment pas de COP, le pH est mesuré avec un pH mètre Tacussel PHN850 ou un pH mètre Hanna-instrument. Lorsqu'un COP est présent dans l'erlen, le suivi du pH est effectué avec du papier pH Whatman type CS qui permet de déterminer le pH dans une gamme de 6 à 8,1 et de 8 à 9,7.

La croissance bactérienne a été évaluée par mesure de la densité optique à 600 nm. La mesure de la DO est effectuée en mini-cuve plastique de 1cm de trajet optique sur un volume de 1 ml. Lorsque la DO est supérieure à 0,7, la suspension bactérienne est diluée au 1/10 avec du milieu de culture neuf. Les spectrophotomètres utilisés pour les mesures de DO sont les modèles Ulstrospec 3000 ou 4000 de la société Pharmacia.

Le taux de VX a été déterminé par CPG en utilisant le même mode opératoire d'extraction et d'analyse que celui décrit au chapitre 2 paragraphe 2-2-3-1.

3-2-3 Essais en réacteur :

Ces essais ont été effectués en réacteur pyrex de 2L (Inceltech) rempli avec 0,8L de milieu réactionnel. Les réacteurs sont équipés de sondes pH et PO₂ (Ingold) et température. La

régulation et l'acquisition des paramètres s'effectuent en continu par l'intermédiaire d'un logiciel spécifique (BIOAC). Le pH est régulé à 7 par addition de NaOH ou KOH 3N. Le milieu est maintenu à 28°C, agité à 200rpm, aéré sous un flux d'air de 100 L.h⁻¹. En fonction du temps sont suivis le pH (sonde ingold), le taux de VX (concentration initiale 0,05g.L⁻¹) par CPG (méthode décrite au chapitre 2 paragraphe 2-2-3-1), l'activité bactérienne par la technique de respirométrie (Buitron-Mendez, 1993) et la croissance bactérienne par turbidité à 600nm. Les réacteurs sont ensemencés par un inoculum préparé comme pour les essais en erlen à partir d'une pré-culture en fin de phase de croissance ou en début de phase stationnaire pour obtenir un absorbance à 600 nm comprise entre 0,3 et 0,5.

3-2-4 ³¹P RMN

L'analyse RMN a été utilisée pour déterminer les sites d'attaque du déméton S-méthyl et du VX par *Corynebacterium glutamicum*. Les micro-organismes sont, avant analyse, éliminés par centrifugation d'une prise d'essai de 1 ml pendant 10 min à 10000g. Après centrifugation 0,6 ml de surnageant sont repris et filtrés au travers d'une membrane de 0,22 µm. A 0,5 ml de surnageant micro-filtré sont ajoutés 50 µl de D₂O. L'analyse RMN est ensuite effectuée dans les mêmes conditions que celles décrites au chapitre 2 paragraphe 2-2-4.

3-3 Résultats expérimentaux

3-3-1 Comparaison de la stabilité du VX en présence de micro-organismes en culture pure

3-3-1-1 Protocole

Le devenir du VX (Ci = 0,05 g.L⁻¹) en présence des micro-organismes d'essai a été étudié à 28°C avec une agitation de 200rpm. Des essais abiotiques ont été effectués dans les mêmes conditions opératoires pour différencier les dégradations abiotique et biologique. Chaque essai a

été effectué en triple (3 erlens par micro-organismes) et pour chaque prise-d'essai deux mesures ont été réalisées par erlen.

3-3-2-2 Résultats

Lactobacillus sake et *Bacillus sphaericus* n'entraînent pas de dégradation biologique du VX dans les conditions opératoires utilisées (Tableau 11). En présence des micro-organismes : *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium petrophilum*, *Rhodococcus opacus*, *Alternaria tenuis* et *Trichoderma viride*, les vitesses de disparition du VX sont supérieures à celles obtenues en conditions abiotiques (Tableau 11). Le VX est dégradé biologiquement par les trois bactéries (*Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium petrophilum*, *Rhodococcus opacus*) pendant la phase exponentielle de croissance que ce soit en milieu BTS ou minéral nutritif (un exemple de cinétique de disparition du VX est donné pour les trois bactéries Figures 9 à 11). Pendant cette phase, la disparition du VX ne peut être attribuée à une alcalinisation du milieu car le pH reste inférieur à 7 (Figures 9 à 11). *Corynebacterium glutamicum* représente la culture qui dégrade le plus efficacement le VX, viennent ensuite *Corynebacterium petrophilum* puis *Rhodococcus opacus* dont la capacité à dégrader le VX reste très limitée. En présence des moisissures, le VX est dégradé lorsque la filamentation mycélienne débute (observation microscopique avec un grossissement X400 de cultures témoins des deux moisissures sans VX), la disparition du VX ne peut pas être attribuée à une sorption du mycélium. La culture d'*Alternaria tenuis* semble plus compétente à biodégrader le VX que *Trichoderma viride* (Figure 12).

Les cultures de *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium petrophilum* et *Alternaria tenuis* dégradent biologiquement le VX ; Parmi ces souches, *Corynebacterium glutamicum* est la plus efficace.

Tableau 11: Vitesses initiales* ($\mu\text{m.h}^{-1}$) et constantes* (h^{-1}) de disparition du VX en présence de micro-organismes en culture pure et en conditions abiotiques à 28°C et 200rpm .

<u>Micro-organisme</u>	<u>Milieu d'essai</u>	<u>Vitesses biotiques</u>	<u>Vitesses abiotiques</u>	<u>Vitesses biologiques</u>
		$\mu\text{m.h}^{-1}$	$\mu\text{m.h}^{-1}$	$\mu\text{m.h}^{-1}$
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	BTS Minéral nutritif (glucose)	$3,7 \pm 0,2$ $5,8 \pm 0,3$	$1 \pm 0,05$ $2 \pm 0,1$	2.7 3.8
<i>Corynebacterium petrophilum</i>	BTS Minéral nutritif (glucose)	$3,3 \pm 0,2$ $4,4 \pm 0,25$	$1 \pm 0,03$ $2 \pm 0,07$	2.3 2.4
<i>Rhodococcus opacus</i>	BTS Minéral nutritif (glucose)	$1,6 \pm 0,1$ $3,4 \pm 0,2$	$1 \pm 0,05$ $2 \pm 0,1$	0.6 1.4
<i>Alternaria tenuis</i>	Czapek	$1,9 \pm 0,1$	$0,47 \pm 0,04$	1.4
<i>Trichoderma viride</i>	Czapek	$1 \pm 0,03 \mu\text{m.h}^{-1}$	$0,47 \pm 0,04$	0,5
<i>Bacillus phaericus</i>	BTS Minéral nutritif (glucose)	$1,1 \pm 0,02$ $2,3 \pm 0,15$	$1 \pm 0,1$ $2 \pm 0,1$	0.1 0,3
<i>Lactobacillus sake</i>	Niven	6,3	6.3	0

* Calculées sur 6 valeurs (2 dosages pour 3 essais)

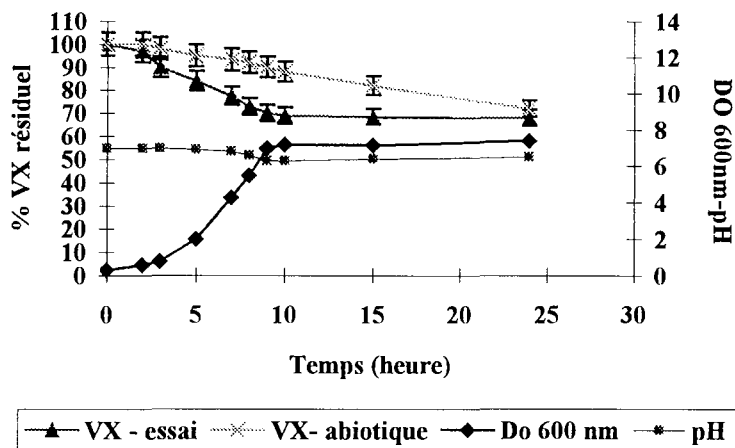


Figure 9 : Disparition du VX ($C_i = 0.05 \text{ g.L}^{-1}$) en présence de *Corynebacterium glutamicum* en milieu minéral nutritif (extrait de levure et glucose 5 g.L^{-1} , tampon phosphate 15 g.L^{-1}) à pH initial 7, 28°C et 200rpm. Détermination par CPG. Moyennes calculées sur 6 valeurs (2 dosages pour 3 essais).

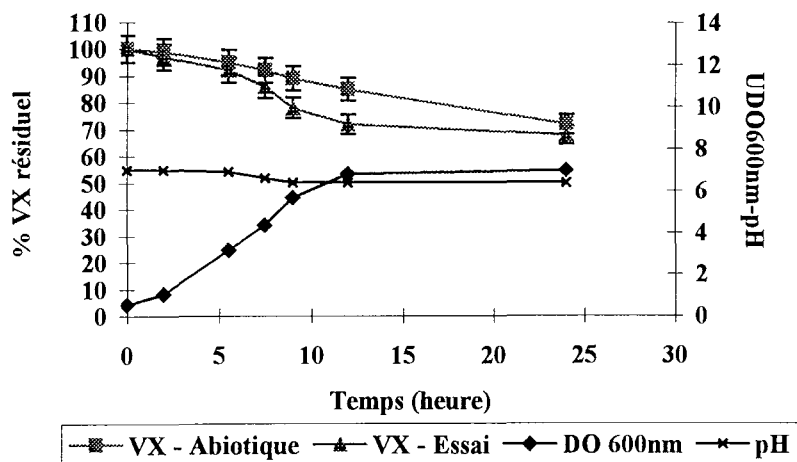


Figure 10 : Disparition du VX ($C_i = 0.05 \text{ g.L}^{-1}$) en présence de *Corynebacterium petrophilum* en milieu minéral nutritif (extrait de levure et glucose 5 g.L^{-1} , tampon phosphate 15 g.L^{-1}) à pH initial 7, 28°C et 200rpm. Détermination par CPG. Moyennes calculées sur 6 valeurs (2 dosages pour 3 essais).

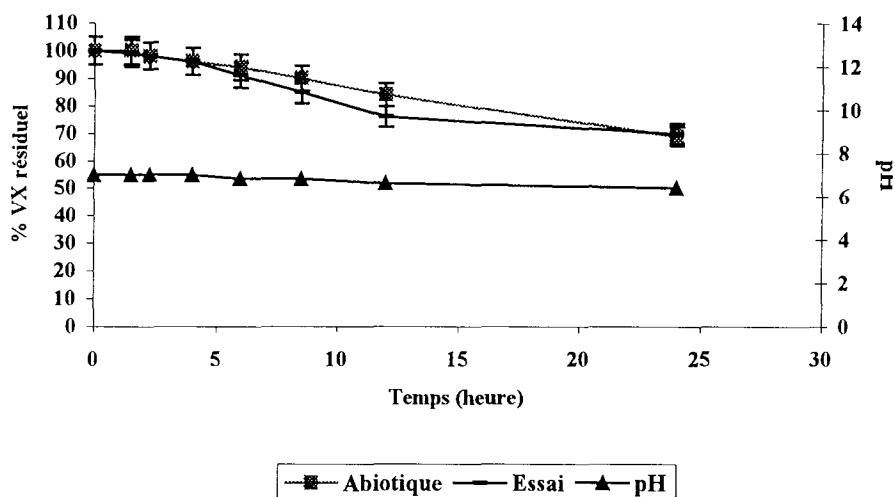


Figure 11 : Disparition du VX ($C_i = 0.05 \text{ g.L}^{-1}$) en présence de *Rhodococcus opacus* en milieu minéral nutritif (extrait de levure et glucose 5 g.L^{-1} , tampon phosphate 15 g.L^{-1}) à pH initial 7, 28°C et 200rpm. Détermination par CPG. Moyennes calculées sur 6 valeurs (2 dosages sur 3 essais).

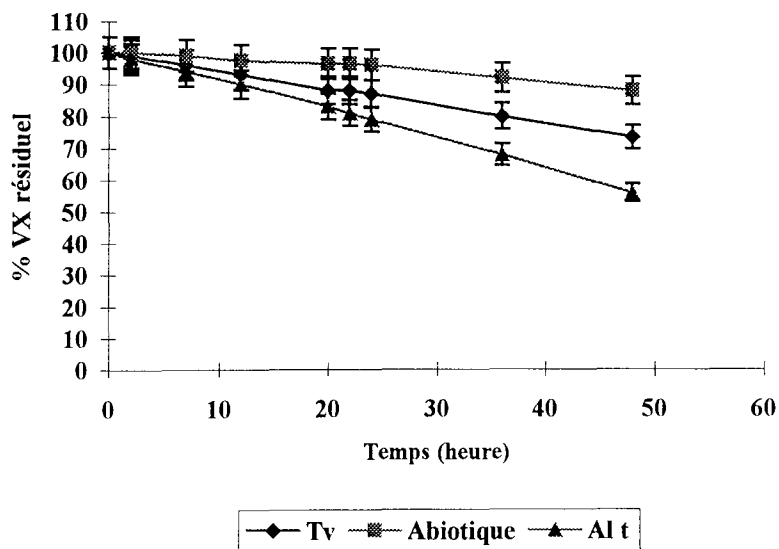


Figure 12 : Disparition du VX ($C_i = 0,05 \text{ g.L}^{-1}$) en présence de *Trichoderma viride* (Tv) ou *Alternaria tenuis* (Alt) en milieu Czapek (glucose 5 g.L^{-1}) à pH initial 6,5, 28°C , 200rpm. Détermination par CPG. Moyennes calculées sur 6 valeurs (2 dosages pour 3 essais).

3-3-2 Effet de l'extrait de levure et des peptones sur la dégradation biologique du VX par *Corynebacterium glutamicum*.

3-3-2-1 Protocole

Pour évaluer le rôle de l'extrait de levure et des peptones sur la dégradation biologique du VX par *Corynebacterium glutamicum*, le devenir du VX ($C_i = 0.05 \text{ g.L}^{-1}$) a été suivi en présence de la bactérie en milieu minéral nutritif contenant du glucose ou fructose (5 g.L^{-1}), du tampon phosphate (15 g.L^{-1}) et une gamme de concentrations d'extrait de levure à $0.2-1-3-5$ et 10 g.L^{-1} ou de peptones à 1 et 5 g.L^{-1} . Les essais ont été conduits à 28°C et 200rpm . Chaque essai a été effectué en triple (3 erlens par micro-organisme) et pour chaque prise-d'essai, deux mesures ont été réalisées par erlen.

3-3-2-2 Résultats

Le VX est dégradé biologiquement pendant la phase exponentielle de croissance de *Corynebacterium glutamicum* que ce soit en présence d'extrait de levure ou de peptone. Les vitesses de disparition du VX en milieu minéral nutritif en fonction de la concentration d'extrait de levure ou de peptone font l'objet du tableau 12. Un exemple des cinétiques de disparition du VX en présence de peptone (pep) est donné Figure 13. La concentration d'extrait de levure ou de peptones n'a pas d'incidence sur la dégradation abiotique du VX (vitesse de l'ordre de $2 \mu\text{M.h}^{-1}$ quelle que soit la concentration). La vitesse de dégradation du VX en présence de *Corynebacterium glutamicum* croît avec l'augmentation de la concentration en extrait de levure par contre elle n'augmente pas de façon significative avec l'augmentation de la concentration de peptones. Pour la même concentration en peptones ou en extrait de levure, la vitesse de disparition biologique du VX est plus grande en présence de peptone ($6 \pm 0,2 \mu\text{M.h}^{-1}$ contre $2 \pm 0,05 \mu\text{M.h}^{-1}$ pour 1 g.L^{-1}).

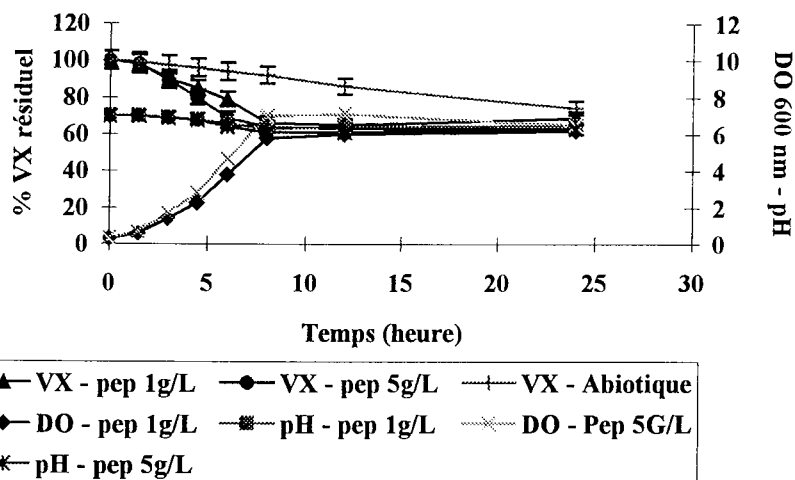


Figure 13 : Disparition du VX ($C_i = 0,05 \text{ g.L}^{-1}$) en présence de *Corynebacterium glutamicum* en milieu minéral complet (glucose 5 g.L^{-1} , tampon phosphate 15 g.L^{-1}) avec 1 ou 5 g.L^{-1} d'extrait de peptone (pep). pH initial 7 , 28°C , 200rpm . Détermination par CPG. Moyenne calculées sur 6 valeurs (2 dosages pour 3 essais).

Tableau 12 : Vitesses de disparition (moyennes calculées sur 6 valeurs) du VX en présence de *Corynebacterium glutamicum* (vitesses calculées pendant la phase exponentielle de croissance de la souche) et en conditions abiotiques en milieu minéral nutritif (glucose 5 g.L^{-1} , tampon phosphate 15 g.L^{-1}) à concentrations variables d'extrait de levure ou de peptone. pH initial 7 , 28°C et 200rpm .

Concentration d'extrait de levure ou peptones g.L^{-1}	Vitesse de disparition Totale du VX $\mu\text{M.h}^{-1}$	Vitesse de disparition abiotique du VX $\mu\text{M.h}^{-1}$	Vitesse de disparition biologique du VX $\mu\text{M.h}^{-1}$
Extrait de levure 0.2	$3,2 \pm 0,1$	$2 \pm 0,05$	$1,2$
Extrait de levure 1	$3,7 \pm 0,2$	$1,8 \pm 0,05$	$1,9$
Extrait de levure 3	$4,5 \pm 0,1$	$1,75 \pm 0,05$	$2,75$
Extrait de levure 5	$6 \pm 0,15$	$1,95 \pm 0,05$	4
Extrait de levure 10	$6,6 \pm 0,2$	$2 \pm 0,05$	$4,6$
Peptones 1	$7,9 \pm 0,25$	$1,95 \pm 0,05$	6
Peptones 5	$8,4 \pm 0,25$	$1,95 \pm 0,05$	$6,5$

3-3-3 Effet du sucre (glucose ou fructose) sur la dégradation biologique du VX par *Corynebacterium glutamicum*.

3-3-3-1 Protocole

Le devenir du VX ($C_i = 0,05 \text{ g.L}^{-1}$) a été suivi en présence de la bactérie en milieu minéral nutritif contenant de l'extrait de levure (5 g.L^{-1}), du tampon phosphate (15 g.L^{-1}) et une gamme de concentrations de glucose ou fructose à 0-1-5 et 10 g.L^{-1} . Les essais ont été conduits à 28°C et 200rpm. Chaque essai a été effectué en triple (3 erlens par micro-organisme) et pour chaque prise-d'essai, deux mesures ont été réalisées par erlen.

3-3-3-2 Résultats

Le tableau 13 indique les vitesses de disparition du VX en présence de concentrations variables de glucose ou fructose. En conditions abiotiques, selon la concentration de fructose ou de glucose, la vitesse de disparition du VX fluctue entre 1.8 et $2.1 \mu\text{M.h}^{-1}$, la concentration de sucre n'a pas d'influence sur la dégradation abiotique du COP. Avec *Corynebacterium glutamicum*, la vitesse de dégradation du VX est de l'ordre de $2.5 \mu\text{M.h}^{-1}$ sans sucre et fluctue entre 5.4 et $8 \mu\text{M.h}^{-1}$ en présence de sucre dans le milieu de culture. L'extrait de levure seul permet le développement de la bactérie mais pas la dégradation biologique du VX. La présence de sucre est nécessaire à la dégradation biologique du VX par *Corynebacterium glutamicum*. La dégradation biologique se produit pendant la phase exponentielle de croissance (Figure 14). Le pH reste stable lorsque la bactérie est cultivée sur extrait de levure en absence de sucre alors qu'il chute de 7 à 6.3/6.1 en présence de sucre, la dégradation biologique observée du VX en présence de sucre ne peut être liée à une alcalinisation du milieu.

Les cultures de *Corynebacterium glutamicum* présentent un taux de croissance (μ) de 0.21 h^{-1} avec 5 g.L^{-1} de fructose et $\mu = 0.3 \text{ h}^{-1}$ pour 10 g.L^{-1} du même sucre (figure 14) mais l'augmentation du taux de croissance ne modifie pas la cinétique de dégradation du VX.

Tableau 13 : Vitesses de disparition du VX en présence de *Corynebacterium glutamicum* (vitesses calculées pendant la phase exponentielle de croissance) et en conditions abiotiques en milieu minéral nutritif (extrait de levure 5 g.L⁻¹, tampon phosphate 15 g.L⁻¹) à concentrations variables de glucose ou fructose. PH initial 7, 28°C et 200rpm.

Concentration de sucre g.L ⁻¹	Vitesse de disparition totale du VX μM.h ⁻¹	Vitesse de disparition Abiotique du VX μM.h ⁻¹	Vitesse de disparition Biologique du VX μM.h ⁻¹
0*	2,5 ± 0,1	2 ± 0,05	0,5
Glucose 1	5,4 ± 0,2	1,8 ± 0,05	3,6
Glucose 5	6 ± 0,2	1,95 ± 0,05	4
Glucose 10	7,5 ± 0,25	1,8 ± 0,05	5,7
Fructose 1	5,6 ± 0,2	1,8 ± 0,05	3,8
Fructose 5	7 ± 0,25	2,1 ± 0,05	4,9
Fructose 10	8 ± 0,25	1,8 ± 0,05	6,2

*en absence de sucre la croissance est supportée par l'extrait de levure.

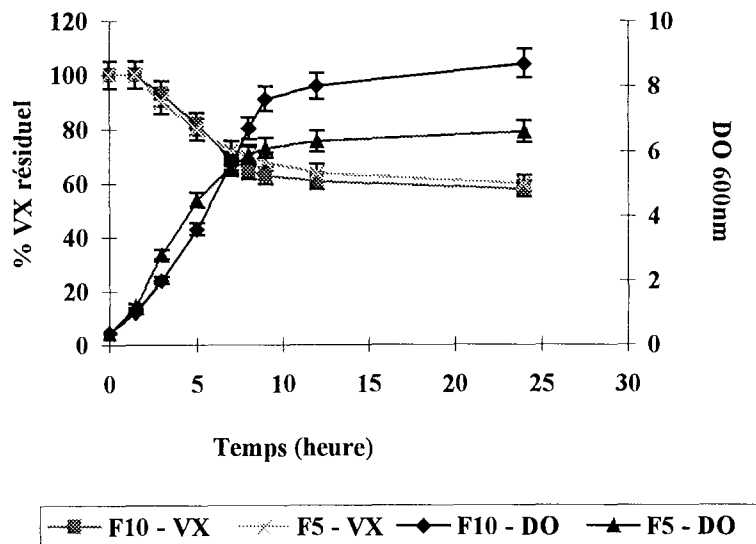


Figure 14 : Disparition du VX (Ci = 0,05 g.L⁻¹) en présence de *Corynebacterium glutamicum* en milieu minéral complet (extrait de levure 5 g.L⁻¹, tampon phosphate 15 g.L⁻¹) avec 5 ou 10 g.L⁻¹ de fructose (F). pH initial 7, 28°C, 200rpm. Détermination par CPG. Moyennes calculées sur 6 valeurs.

3-3-4 Effet du taux de croissance et de la biomasse sur la biodégradation du VX par *Corynebacterium glutamicum*.

3-3-4-1 Protocole

Le devenir du VX ($C_i = 0.05 \text{ g.L}^{-1}$) a été suivi en présence de la bactérie en milieu minéral nutritif contenant du glucose ou fructose (5 ou 10 g.L^{-1}), du tampon phosphate (15 g.L^{-1}), de l'extrait de levure ou des peptones à 1 et 5 g.L^{-1} pour déterminer si la vitesse de disparition du VX était liée au taux de croissance ou à la biomasse générée lors de la culture. Les essais ont été conduits à 28°C et 200rpm. Chaque essai a été effectué en triple (3 erlens par micro-organisme) et pour chaque prise d'essai, deux mesures (DO et CPG) ont été réalisées par erlen.

3-3-4-2 Résultats

Les valeurs des taux de croissance, quantités de biomasse obtenues en fin de phase exponentielle de croissance et vitesses de dégradation du VX sont reportés tableau 14. L'observation microscopique des bactéries (grossissement 400 et 1000) indique qu'il n'y a pas de différence de taille des bactéries ou de présence de filamentation lors de la phase exponentielle de croissance de *Corynebacterium glutamicum* sur les différents milieux, les mesures de DO sont donc comparables d'un essai à l'autre.

Les vitesses de dégradation biologique du VX ne peuvent être liées ni à la quantité de biomasse générée ni au taux de croissance, ces vitesses dépendent plutôt des constituants du milieu de culture, la vitesse de dégradation biologique du VX croit avec l'augmentation de la concentration en extrait de levure ou de peptone.

Tableau 14 : Taux de croissance, biomasse, vitesses de disparition du VX (calculés pendant la phase exponentielle de croissance) en présence de *Corynebacterium glutamicum* en milieu minéral nutritif (tampon phosphate 15 g.L⁻¹) à concentrations variables de glucose, fructose, extrait de levure, peptone. pH initial 7, 28°C et 200rpm.

Concentration de sucre, extrait de levure ou peptone g.L ⁻¹	Taux de croissance h ⁻¹	Biomasse* DO 600nm	Vitesses de disparition du VX μM.h ⁻¹
Extrait de levure 5	0,18	3,8 ± 0,2	2,5 ± 0,1
Peptone 5	0,2	2,5 ± 0,12	2,6 ± 0,1
Extrait de levure 0.2 Glucose 5	0,18	2 ± 0,1	3,2 ± 0,1
Extrait de levure 5 Glucose 5	0,44	7± 0,3	6 ± 0,18
Peptone 1 Glucose 5	0,37	5,8 ± 0,2	7,9 ± 0,2
Peptone 5 Glucose 5	0,4	7 ± 0,3	8,4 ± 0,2
Extrait de levure 5 Fructose 5	0,35	5,7 ± 0,2	7± 0,2
Extrait de levure 5 Fructose 10	0,33	7,6 ± 0,3	8 ± 0,2
Peptone 5 Fructose 5	0,37	5,2 ± 0,3	9,2 ± 0,25

* Biomasse mesurée en fin de phase exponentielle

3-3-5 Effet de la concentration de tampon phosphate sur la dégradation du VX par *Corynebacterium glutamicum*.

3-3-5-1 Protocole

Le devenir du VX (Ci = 0,05 g .L⁻¹) a été suivi en présence de la bactérie en milieu minéral nutritif (fructose 10 g.L⁻¹ et extrait de levure 5 g.L⁻¹) à des concentrations variables de tampon phosphate pour déterminer si la vitesse de disparition du VX pouvait être liée à la concentration de

tampon phosphate. Les essais ont été conduits à 28°C et 200rpm en erlen (concentration de tampon phosphate 5 ;15 ;20 g.L⁻¹) et réacteur (concentration de tampon phosphate 0 et 15 g.L⁻¹).

3-3-5-2 Résultats

Les vitesses de dégradation du VX obtenues en fonction de la concentration en tampon phosphate lors des essais en erlen font l'objet du Tableau 15. La vitesse de dégradation biologique du VX croît avec l'augmentation de la concentration en tampon phosphate (Figure 15, tableau 15), le passage de 15 g.L⁻¹ à 20 g.L⁻¹ entraîne une augmentation de la vitesse d'un facteur de 2.2 (Tableau 15). En absence de tampon phosphate, *Corynebacterium glutamicum* dégrade 10% du VX en 24 heures alors qu'en présence de tampon phosphate, 40% du VX initial est dégradé en 8 heures (Figure 16). La présence de tampon phosphate est nécessaire à la dégradation biologique du VX par *Corynebacterium glutamicum*.

Tableau 15 : Vitesses de disparition du VX en présence de *Corynebacterium glutamicum* (vitesses calculées pendant la phase exponentielle de croissance) et en conditions abiotiques en milieu minéral nutritif (extrait de levure 5 g.L⁻¹, fructose 10 g.L⁻¹) à concentrations variables de tampon phosphate. pH initial 7, 28°C et 200 rpm.

Concentration de tampon phosphate g.L ⁻¹	Vitesses de disparition totale du VX μM.h ⁻¹	Vitesses de disparition Abiotique du VX μM.h ⁻¹	Vitesses de dégradation biologique μM.h ⁻¹
5	4,38	1,2	3,18
15	7,5	2,4	5,1
20	14,6	3,4	11,2

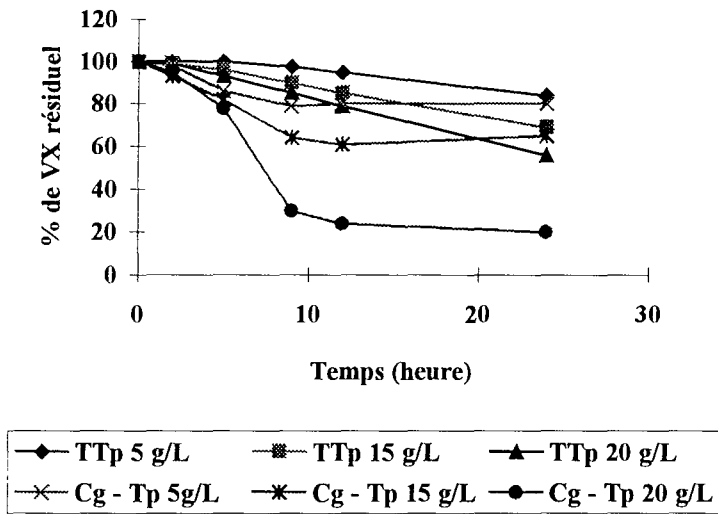


Figure 15 : Disparition du VX ($C_i = 0.05 \text{ g.L}^{-1}$) en présence de *Corynebacterium glutamicum* (Cg-Tp) et en conditions abiotiques (TTp) en milieu minéral nutritif (extrait de levure 5 g.L^{-1} , fructose 10 g.L^{-1}) à différentes concentration de tampon phosphate , à pH initial 7, 28°C et 200rpm. Détermination par CPG. Moyenne calculée sur 4 valeurs.

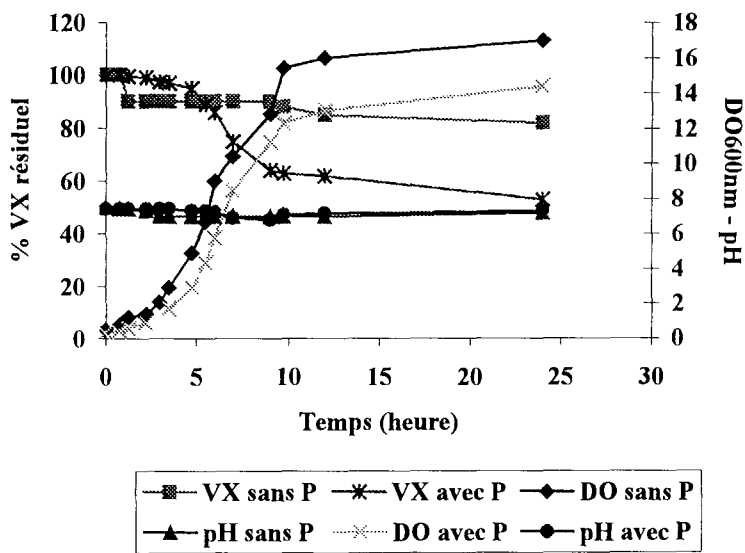


Figure 16 : Disparition du VX ($C_i = 0.05 \text{ g.L}^{-1}$) en présence de *Corynebacterium glutamicum* en réacteur en milieu minéral nutritif (extrait de levure 5 g.L^{-1} , fructose 10 g.L^{-1}) avec 0 ou 15 g.L^{-1} de tampon phosphate. 28°C et 200rpm. Détermination par CPG. Moyenne calculée sur 4 valeurs

3-3-6 Recherche de la capacité de *Corynebacterium glutamicum* à dégrader biologiquement le déméton-S-méthyl et le tétriso.

3-3-6-1 Protocole

Le devenir des deux composées organophosphorés ($C_i = 0.05 \text{ g.L}^{-1}$) a été suivi en présence de la bactérie en milieu minéral nutritif (fructose 10 g.L^{-1} , tampon phosphate 15 g.L^{-1} , extrait de levure 5 g.L^{-1}).

3-3-6-2 Résultats

Le tétriso et le déméton-S-méthyl sont dégradés biologiquement par *Corynebacterium glutamicum* (figures 17 et 18). La dégradation est observée pendant la phase de croissance exponentielle pour le tétriso (figure 17), la vitesse de dégradation pendant cette phase est de $3 \mu\text{M.h}^{-1}$ contre $0.7 \mu\text{M.h}^{-1}$ en conditions abiotiques. Le déméton-S-méthyl est dégradé biologiquement en phase exponentielle de croissance et en phase stationnaire (Figure 18), la vitesse de dégradation de ce COP étant plus forte pendant la phase exponentielle de croissance que pendant la phase stationnaire ($13 \mu\text{M.h}^{-1}$ contre $3 \mu\text{M.h}^{-1}$).

3-3-7 Détermination de l'effet de l'extrait de levure, du tampon phosphate et des sucres sur la biodégradation du déméton-S-méthyl par *Corynebacterium glutamicum*.

3-3-7-1 Protocole

Le devenir du déméton-S-méthyl a été suivi en présence de la bactérie en milieu minéral nutritif avec des concentrations en sucres, tampon phosphate et extrait de levure variables.

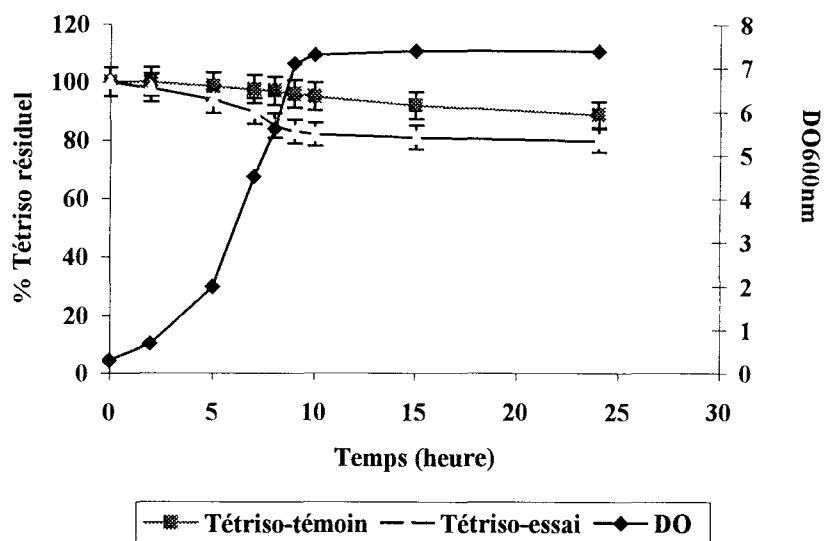


Figure 17 : Disparition du tétriso ($C_i = 0.05 \text{ g.L}^{-1}$) en présence de *Corynebacterium glutamicum* en milieu minéral nutritif (extrait de levure 5 g.L^{-1} , glucose 5 g.L^{-1} , tampon phosphate 15 g.L^{-1}) en erlen à pH initial 7, 28°C et 200rpm. Détermination par CPG. Moyennes calculées sur 6 valeurs.

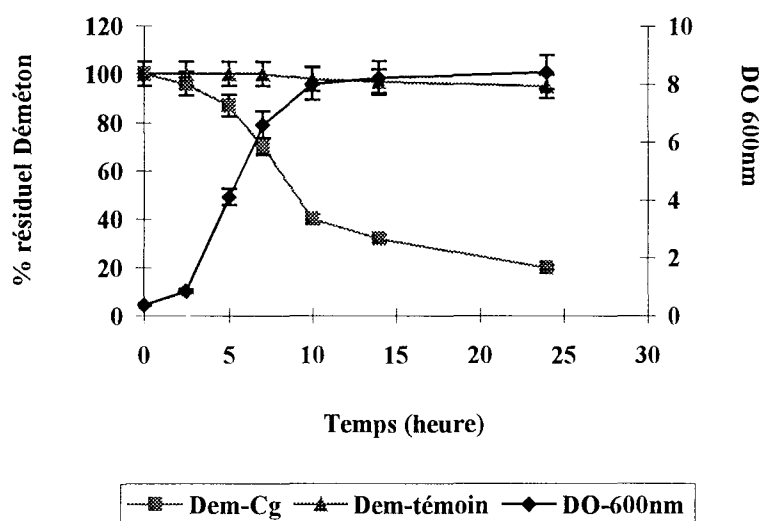


Figure 18 : Disparition du déméton-S-méthyl ($C_i = 0.05 \text{ g.L}^{-1}$) en présence de *Corynebacterium glutamicum* en milieu minéral nutritif (extrait de levure 1 g.L^{-1} , glucose 5 g.L^{-1} , tampon phosphate 15 g.L^{-1}) en erlen à pH initial 7, 28°C et 200rpm. Détermination par CPG.

3-3-7-2 Résultats

Le tableau 16 montre que les vitesses de dégradation du déméton-S-méthyl par *Corynebacterium glutamicum* ne sont influencées ni par la nature du sucre ni par la concentration en tampon phosphate. La concentration en extrait de levure, par contre, a un effet sur la dégradation biologique du déméton-S-méthyl, car la dégradation de ce composé diminue avec l'augmentation de la concentration d'extrait de levure du milieu (figure 19).

Tableau 16 : Vitesses de dégradation biologique du déméton-S-méthyl par *Corynebacterium glutamicum* en phase de croissance exponentielle en milieu minéral nutritif (extrait de levure 1 g.L⁻¹) en présence de glucose ou fructose (5 g.L⁻¹) et concentrations variables de tampon phosphate

Concentration en sucre, extrait de levure, tampon phosphate (g.L ⁻¹)	Vitesses de dégradation μM.h ⁻¹
Glucose 5, extrait de levure 1 Tampon phosphate 15	13 ± 0,6
Glucose 5, extrait de levure 1 Tampon phosphate 20	12 ± 0,6
Fructose 5, extrait de levure 1 Tampon phosphate 15	11 ± 0,6
Fructose 5, extrait de levure 1 Tampon phosphate 20	11 ± 0,6

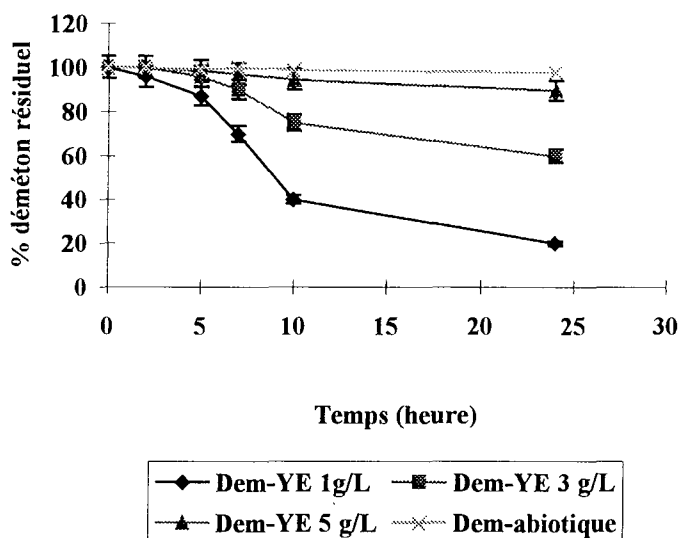


Figure 19 : Disparition du déméton-S-méthyl ($C_i = 0.05 \text{ g.L}^{-1}$) en présence de *Corynebacterium glutamicum* en milieu minéral nutritif (glucose 5 g.L^{-1} , tampon phosphate 15 g.L^{-1}) avec 1 ; 3 et 5 g.L^{-1} d'extrait de levure en erlen à pH initial 7, 28°C et 200rpm. Détermination par CPG. Moyennes calculées sur 6 valeurs.

3-3-8 Recherche des produits de dégradation biologique du VX et du déméton-S-méthyl.

3-3-8-1 Protocole

Les produits de dégradation des deux COP ont été recherchés par ^{31}P RMN et CPG, à partir de culture en erlen de *Corynebacterium glutamicum* en milieu minéral nutritif (fructose 10 g.L^{-1} , extrait de levure 5 g.L^{-1} , tampon phosphate 15 g.L^{-1} pour le VX et fructose ou glucose 5 g.L^{-1} , extrait de levure 1 g.L^{-1} , tampon phosphate 15 g.L^{-1} pour le déméton-S-méthyl). Les cultures ont été conduites avec 0.05 g.L^{-1} de COP, en fonction du temps, la concentration de COP a été mesurée par CPG et un aliquote de milieu réactionnel a été parallèlement analysé par ^{31}P RMN.

3-3-8-2 Résultats

L'analyse ^{31}P RMN a montré, lors de la dégradation biologique du déméton-S-méthyl la formation et l'accumulation dans le milieu de culture de diméthyl thiophosphate (Figure 20, tirée de Girbal *et al.*, 2000). L'apparition de ce composé correspond à une rupture de la liaison C-S du déméton-S-méthyl occasionnée par *Corynebacterium glutamicum*.

Lors de l'étude de la dégradation du VX par *Corynebacterium glutamicum*, l'analyse ^{31}P RMN a montré (Figure 21) :

- l'apparition d'acide éthyl méthylphosphonique (EMPA) qui est généré par l'hydrolyse de la liaison P-S,
- l'absence de produit de dégradation due à une rupture de la liaison C-S.

l'analyse CPG (détecteur NPD) ne montre pas l'apparition de diisopropylaminoéthanediol (DPAT) en présence de *Corynebacterium glutamicum*. La bactérie dégrade le VX par rupture de la liaison P-S, l'EMPA s'accumule mais le DPAT n'est pas retrouvé dans le milieu de culture.

3-3-9 Dégradation biologique du diisopropylaminoéthanethiol (DPAT) par *Corynebacterium glutamicum*

3-3-9-1 Protocole.

Du VX ($C_i = 0.05 \text{ g.L}^{-1}$) a été hydrolysé (rupture de la liaison P-S) par voie chimique en milieu minéral nutritif (extrait de levure et glucose 5 g.L^{-1} , tampon phosphate 15 g.L^{-1}) stérile (400 ml) à 28°C , pH 7 et 200rpm pendant 4 jours. La dégradation du VX et l'apparition du DPAT ont été suivies par CPG (détecteur NPD). A l'issue des 4 jours de dégradation abiotique les 400 ml ont été répartis en 4 lots de 100 ml conditionnés en erlen en verre de 300 ml bouchés avec du coton cardé. 2 lots ont étéensemencés avec *Corynebacterium glutamicum*, 2 lots ont été conservés comme témoin. Les 4 erlens ont été incubés à 28°C et 200rpm, le devenir du DPAT a été suivi par CPG.

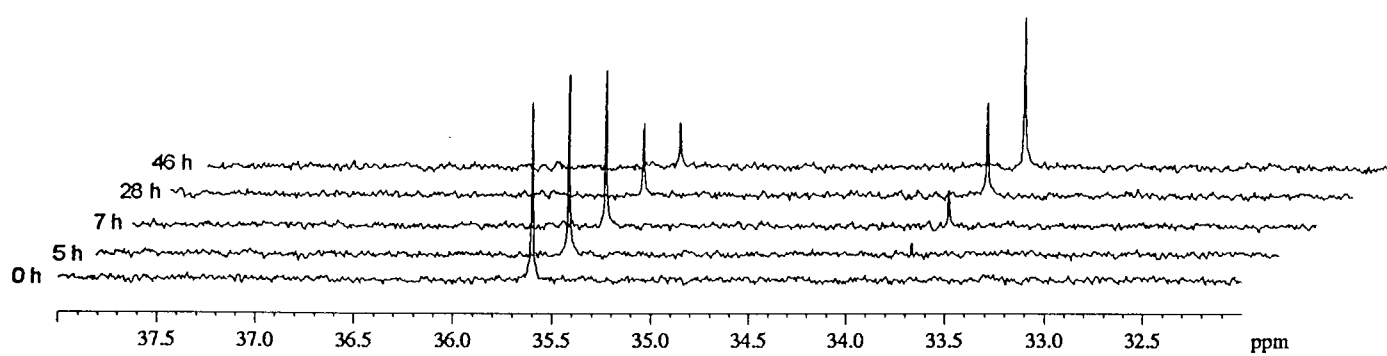


Figure 20 : Spectres ³¹P RMN relatifs à la formation du diméthyl thiophosphate (DTP) lors de la biodégradation du déméton-S-méthyl (DMS) par *Corynebacterium glutamicum*.

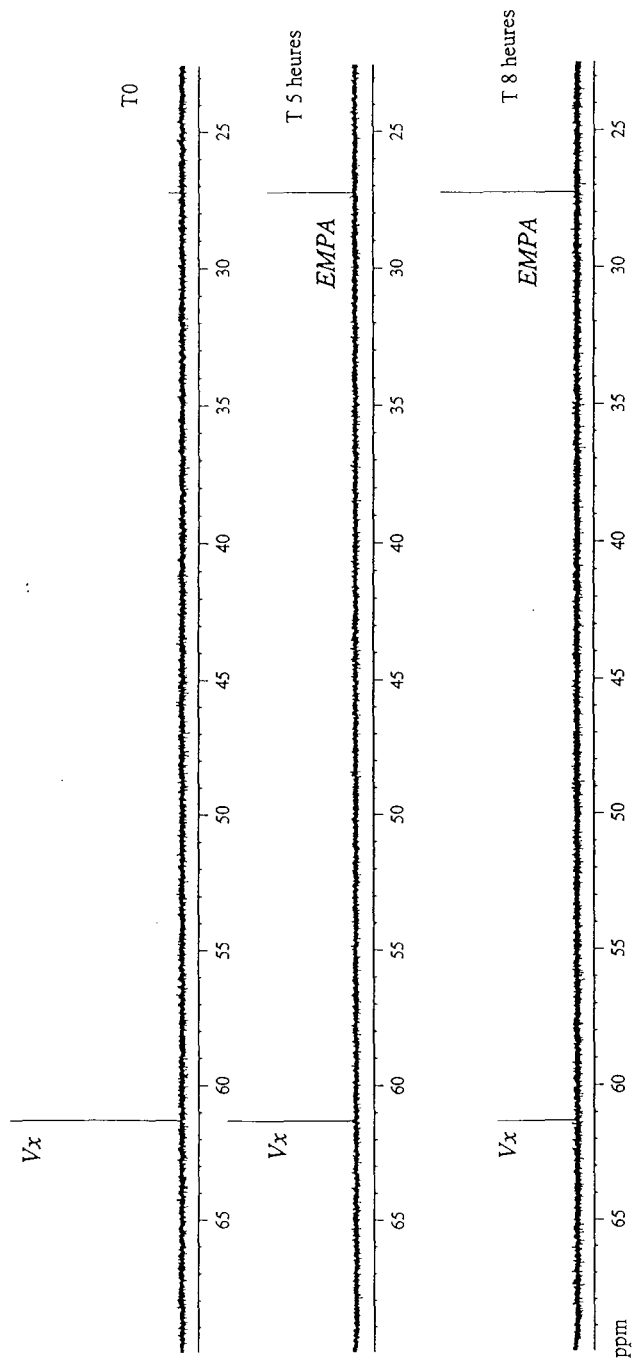


Figure 21 : Spectres ^{31}P RMN relatifs à la formation de l'EMPA lors de la biodégradation du VX par *Corynebacterium glutamicum*.

3-3-9-2 Résultats.

Le DPAT disparaît en présence de la bactérie pendant les phases exponentielle de croissance et stationnaire alors qu'il reste stable en conditions abiotiques (Figure 22). *Corynebacterium glutamicum* est capable de dégrader le produit soufré généré par la rupture de la liaison P-S du VX.

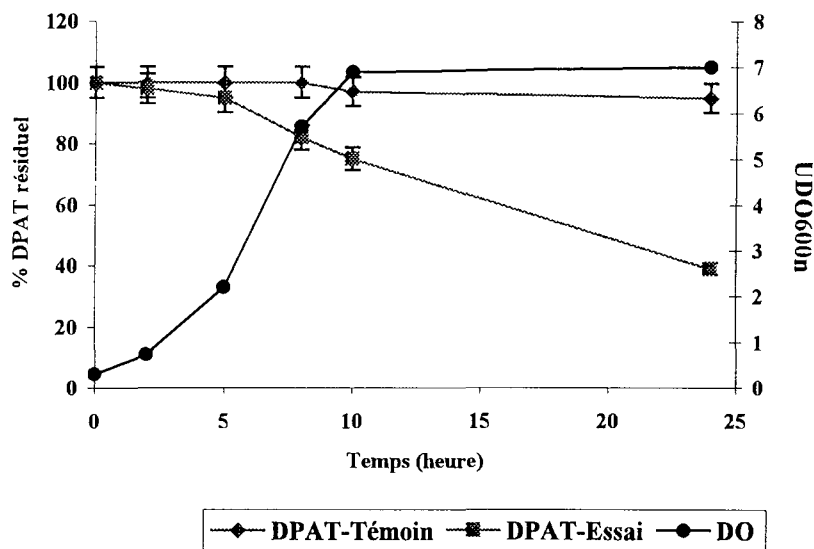


Figure 22 : Disparition du DPAT en présence de *Corynebacterium glutamicum* en milieu minéral nutritif (extrait de levure 5 g.L⁻¹, glucose 5 g.L⁻¹, tampon phosphate 15 g.L⁻¹) en erlen à pH initial 7, 28°C et 200rpm. Détermination par CPG.

3-3-10 Dégradation biologique du VX et du déméton-S-méthyl par *Corynebacterium petrophilum*.

Le but est de déterminer si la dégradation des deux COP à liaison P-S par *Corynebacterium petrophilum* est influencée par la concentration d'extrait de levure ou de tampon phosphate du milieu de culture.

3-3-10-1 Protocole.

Les essais ont été conduits à 28°C, 200rpm en milieu minéral nutritif (VX ou déméton-S-méthyl à 0.05 g.L⁻¹, extrait de levure 1 ou 5 g.L⁻¹, fructose 5 g.L⁻¹, tampon phosphate 10 ;15 ou 20 g.L⁻¹). Le devenir des deux COP a été suivi par CPG.

3-3-10-2 Résultats.

Corynebacterium petrophilum dégrade le VX et le déméton-S-méthyl. Les vitesses maximales de dégradation sont atteintes pendant la phase exponentielle de croissance de la bactérie (Figures 23 et 24). La vitesse maximale de dégradation biologique du VX (5 μM.h⁻¹) est obtenue avec 5 g.L⁻¹ d'extrait de levure alors que la vitesse maximale de dégradation biologique du déméton-S-méthyl (8 μM.h⁻¹) est atteinte avec 1 g.L⁻¹ d'extrait de levure et 10 g.L⁻¹ de tampon phosphate. Les vitesses de dégradation biologique du VX et du déméton-S-méthyl ne sont pas augmentées par les mêmes facteurs, il ressort que l'extrait de levure et le tampon phosphate favorisent la dégradation biologique du VX par *Corynebacterium petrophilum* alors que le contraire est observé pour le déméton-S-méthyl (tableau 17). Les rôles de l'extrait de levure et du tampon phosphate sont identiques sur la dégradation du VX et du déméton-S-méthyl pour *Corynebacterium glutamicum* et *petrophilum*.

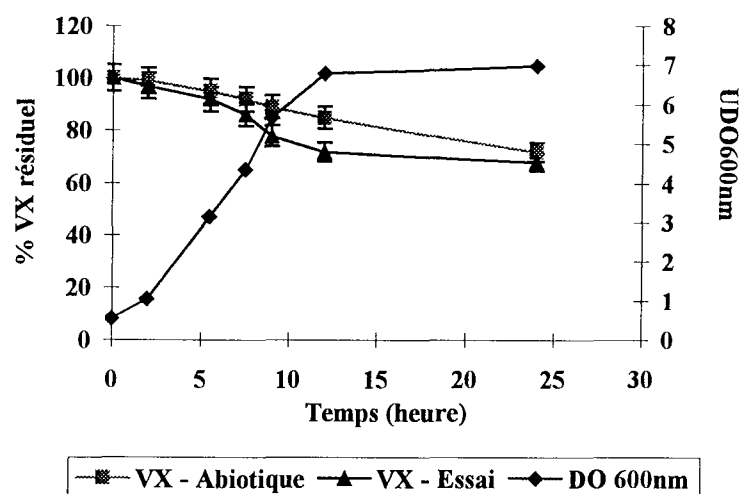


Figure 23 : Disparition du VX ($C_i = 0.05 \text{ g.L}^{-1}$) en présence de *Corynebacterium petrophilum* en milieu minéral nutritif (extrait de levure 5 g.L^{-1} , fructose 5 g.L^{-1} , tampon phosphate 15 g.L^{-1}). pH initial 7, 28°C et 200rpm. Détermination par CPG.

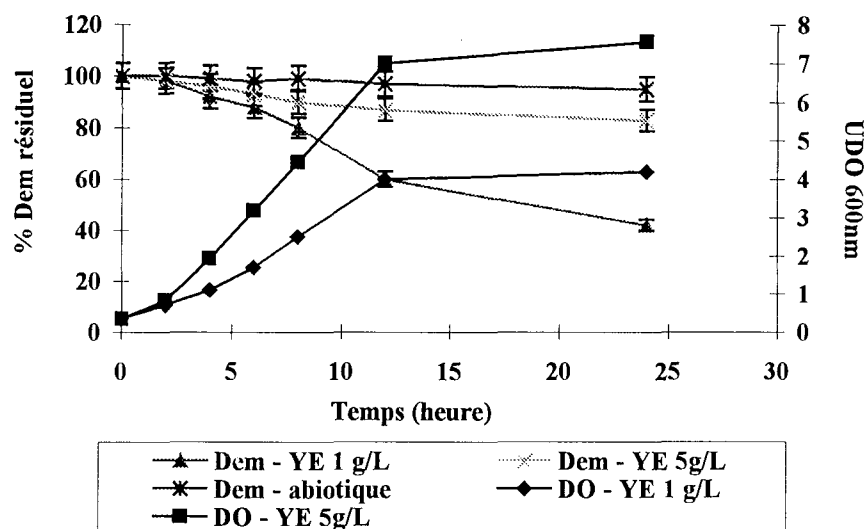


Figure 24 : Disparition du Déméton-S-méthyl ($C_i = 0.05 \text{ g.L}^{-1}$) en présence de *Corynebacterium petrophilum* en milieu minéral nutritif (extrait de levure 1 ou 5 g.L^{-1} , fructose 5 g.L^{-1} , tampon phosphate 15 g.L^{-1}). pH initial 7, 28°C et 200rpm. Détermination par CPG.

Tableau 17 Vitesses de disparition du VX et du déméton-S-méthyl (calculées pendant la phase exponentielle de croissance) en présence de *Corynebacterium petrophilum* en milieu minéral nutritif (fructose 5 g.L⁻¹) à concentrations variables d'extrait de levure et de tampon phosphate. pHinitial 7, 28°C et 200rpm.

COP	Concentration (g.L ⁻¹) YE ⁽¹⁾ TP ⁽²⁾	Vitesses de disparition totale ⁽³⁾ (μM.h ⁻¹)	Vitesses de disparition abiotique (μM.h ⁻¹)	Vitesses de disparition biologique (μM.h ⁻¹)
VX	YE = 1 TP = 15	3 ± 0,18	2 ± 0,1	1
VX	YE = 5 TP = 15	4,37 ± 0,22	2,1 ± 0,1	2,3
VX	YE = 5 TP = 20	8,8 ± 0,4	3,4 ± 0,15	5,4
Déméton-S- méthyl	YE = 5 TP = 15	2,3 ± 0,15	0,45 ± 0,15	1,85
Déméton-S- méthyl	YE = 1 TP = 10	8,7 ± 0,4	0,43 ± 0,02	8,3
Déméton-S- méthyl	YE = 1 TP = 15	7,2 ± 0,3	0,45 ± 0,02	6,75
Déméton-S- méthyl	YE = 1 TP = 20	6,5 ± 0,3	0,42 ± 0,02	6,1

(1) extrait de levure

(2) tampon phosphate

(3) vitesse biologique et abiotique

3-4- Discussion.

3-4-1 Biodégradabilité du VX.

Parmi les 7 micro-organismes utilisés dans cette étude seuls 5 micro-organismes : *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium petrophilum*, *Rhodococcus opacus* (bactéries), *Alternaria tenuis* et *Trichoderma viride* (moisissures) se sont révélés capables de dégrader biologiquement le VX ; *Corynebacterium glutamicum* étant le micro-organisme le plus performant. Les essais effectués ont confirmé le potentiel des souches : *Corynebacterium glutamicum*, *Rhodococcus opacus* et *Alternaria tenuis* citées par Hilaire (1995) et Bezeau (1996) à dégrader le VX. Cependant deux nouvelles souches : *Corynebacterium petrophilum* et *Trichoderma viride*, sont apparues aptes à dégrader le VX. Les 3 bactéries dégradant le VX ont pour point commun d'appartenir à la famille des corynéformes, cette famille bactérienne semblant présenter un intérêt dans la dégradation biologique du VX.

Le VX n'est dégradé biologiquement qu'en présence d'une source de carbone et/ou d'énergie auxiliaire mais jamais en tant que source de carbone (résultats non montrés). La dégradation bactérienne du VX est observée principalement pendant la phase exponentielle de croissance, le ou les système(s) enzymatique(s) impliqué(s) paraissant constitutif(s). Les deux moisissures testées dégradent le VX pendant leur croissance, les mécanismes impliqués ne sont pas dus au métabolisme secondaire. Le ou les enzymes mises en jeu dans la réaction de dégradation du VX ne sont pas de nature "C-P lyase" car cette enzyme est inhibée par la présence de phosphate dans le milieu réactionnel (Kertesz *et al.*,1994). Le VX n'est pas utilisé comme source de phosphore.

Les bactéries *Lactobacillus sake* et *Bacillus sphaericus* n'ont présenté aucune activité biodégradante vis à vis du VX dans les conditions opératoires utilisées. Pourtant la bactérie *Bacillus sphaericus* ATCC 12300 avait été préalablement décrite par Bezeau (1996) comme capable de dégrader le VX. Bezeau (1996) avait évalué la capacité de cette souche en utilisant un

procédé de type BSR (batch sequencing reactor) décrit par Buintron Mendez (1993), les différences de résultats observés pourraient suggérer que la dégradation du VX par *Bacillus sphaericus* nécessite une adaptation de la bactérie et l'induction d'enzymes spécifiques.

3-4-2 Dégradation du VX par *Corynebacterium glutamicum* et *Corynebacterium petrophilum*.

Les essais de dégradation du VX par *Corynebacterium glutamicum* permettent de constater que :

- *Corynebacterium glutamicum* a besoin d'un sucre (glucose ou fructose) et de phosphate pour dégrader le VX, la vitesse de dégradation augmentant avec la concentration en tampon phosphate,
- la vitesse de dégradation biologique du VX s'accroît avec l'augmentation de la concentration d'extrait de levure, cependant en présence unique d'extrait de levure comme source de carbone, la souche n'est pas capable de dégrader le VX,
- *Corynebacterium glutamicum* entraîne une rupture de la liaison P-S (hydrolyse) du VX et peut dégrader le DPAT produit soufré généré par la rupture de la liaison P-S,
- Les effets de l'extrait de levure et du tampon phosphate sur la dégradation biologique du VX sont observés à la fois avec *Corynebacterium glutamicum* et *Corynebacterium petrophilum*.

Au vu de ces observations, il apparaît que le système enzymatique susceptible d'hydrolyser le VX est régulé de la même façon chez les deux *Corynebacterium*. Ce système enzymatique est fonctionnel durant la phase exponentielle de croissance, en présence de sucre, cependant la concentration en sucre (comprise entre 1 et 10 g.L⁻¹) ne semble pas influencer la vitesse de dégradation du VX.

Le rôle bénéfique de l'extrait de levure sur la biodégradation de composés organophosphorés avait déjà été cité par Sharmila *et al.* (1989), il est possible que l'extrait de

levure ou les peptones augmentent la synthèse d'enzymes spécifiques ou agissent en tant que cofacteurs de la réaction enzymatique d'hydrolyse du VX.

Le rôle joué par le phosphate minéral sur la dégradation du VX par *Corynebacterium glutamicum* est surprenant car la présence de phosphate minéral a été souvent décrite comme défavorable à la biodégradation des composés organophosphorés (Wanner, 1993) car le phosphate minéral inhibe l'utilisation du composé organophosphoré comme source de phosphore.

Le rôle du phosphate sur la dégradation du VX génère plusieurs questions :

- le phosphate fragilise abiotiquement le VX et rend plus facile son hydrolyse enzymatique?
- le phosphate favorise le transport du VX à l'intérieur des cellules?
- l'excès de phosphate entraîne l'induction d'un système enzymatique d'élimination des phosphates qui serait aussi actif sur le VX?
- le phosphate est un régulateur allostérique du système enzymatique?
- le phosphate induit la synthèse d'une enzyme spécifique de la liaison P-S ?.

Comprendre le rôle du phosphate sur la dégradation biologique du VX par *Corynebacterium glutamicum* n'est pas aisée car en fait le phosphate a des effets très diversifiés sur le métabolisme bactérien. Pour se développer les micro-organismes ont besoin de phosphate qui est un constituant des acides nucléiques, phospholipides, acides teichoïques, nucléotides, protéines phosphorylées, sucres phosphorylés... (Gottschalk, 1985; Torriani, 1990). Cependant la présence de phosphate à des concentrations élevées (plusieurs g.L⁻¹) peut avoir des effets néfastes, Smith *et al.* (1973) indiquent que la durée de vie de six espèces bactériennes gram négatif est diminuée lorsque la concentration en phosphate du milieu de culture était 10 fois supérieure aux besoins des bactéries, et ceci pour différentes sources de carbone, Smith *et al.* (1973) constatent cependant que la concentration de phosphate n'avait pas d'effet sur la phase de croissance des bactéries et la quantité de biomasse produite. Tangney *et al.* (1992) rapportent que la présence de phosphate favorise la phosphorylation du maltose par *Bacillus licheniformis* et permet le passage du sucre

dans la bactérie sous l'action d'un gradient de protons transmembranaires. Cheah *et al.*, (1981) lors d'une étude sur l'action du phosphate sur la synthèse de l'acide teichoïque des parois de *Bacillus subtilis* montrent que toutes les enzymes - sauf la teichoïque acide glucosyl transférase - impliquées dans la synthèse de l'acide teichoïque étaient sensibles à la concentration de phosphate, leur activité augmentant avec le taux de phosphate. La régulation de ces enzymes pourrait être médiée par le phosphate lui-même ou un métabolite phosphorylé. Znamenskaya *et al.* (1994) relatent que l'excès de phosphate est capable de supprimer la synthèse de différentes enzymes de la famille des RNases de *Bacillus*. Haavik (1974), lors de l'étude de la synthèse de la bacitracine par *Bacillus licheniformis*, rapporte qu'un excès de phosphate perturbe généralement la synthèse de métabolites secondaires chez une large variété de micro-organismes, en particulier des concentrations élevées pouvaient inhiber la production de nombreux antibiotiques (streptomycine, bacitracine, néomycine...). Dans le cas de la production de la bacitracine par *Bacillus licheniformis*, Haavik (1974) indique que la concentration en phosphate régule la production de l'antibiotique en influençant le pH et le taux de croissance. Torriani (1990), lors d'une revue sur l'influence de la concentration de phosphate chez le métabolisme d'*Escherichia coli* cite l'implication du phosphate dans la régulation de nombreux gènes.

Parmi les implications du phosphate dans le métabolisme bactérien décrites ci-dessus, certaines ont retenu notre attention comme le rôle du phosphate dans le transport de certains substrats et la régulation d'enzymes intervenant dans la synthèse des parois bactériennes car Chen et Mulchandani (1999) ont indiqué que le transport du parathion ou du paraoxon vers le compartiment intracellulaire est l'étape limitant le processus de biodégradation de ces deux COP par des *Escherichia coli* productrices d'OPH. Marvin *et al.* (1989) augmentent la vitesse de dégradation biologique de certaines molécules en ajoutant des agents perméabilisants tels le tributyl phosphate dans le milieu réactionnel. Il se pourrait donc dans le cas de *Corynebacterium glutamicum* que le phosphate intervienne en facilitant le transport du VX vers le compartiment intrapériplasmique ou cytoplasmique de la bactérie. Cependant, il n'est pas totalement exclu que le phosphate facilite la

catalyse enzymatique en fragilisant chimiquement le VX car le taux de dégradation abiotique du VX augmente aussi avec la concentration en phosphate.

3-4-3 Dégradation du déméton-S-méthyl par *Corynebacterium glutamicum* et *Corynebacterium petrophilum*, comparaison avec le VX.

Le déméton-S-méthyl est dégradé biologiquement par les deux bactéries en présence d'une source de carbone auxiliaire. La dégradation se produit pendant les phases exponentielles de croissance et stationnaire mais la vitesse de dégradation est plus importante pendant la phase de croissance. Le déméton-S-méthyl est biotransformé par rupture de la liaison S-C (résultats non montrés pour *Corynebacterium petrophilum*) que ce soit en présence de glucose ou fructose. Les vitesses de dégradation biologique du déméton-S-méthyl sont équivalentes en présence de glucose ou fructose alors que Girbal *et al.* (1998) ont observé lors d'essais de dégradation biologique du déméton-S-méthyl par *Corynebacterium glutamicum* effectués en réacteur, que la vitesse de dégradation de ce COP est plus rapide en présence de fructose qu'en présence de glucose.

Les conditions de biodégradation du déméton-S-méthyl par *Corynebacterium glutamicum* et *Corynebacterium petrophilum* présentent des différences avec la biodégradation du VX. La vitesse de dégradation biologique du déméton-S-méthyl pendant la phase exponentielle de croissance est 3 fois plus rapide que celle du VX. Le déméton-S-méthyl est dégradé pendant les phases exponentielles de croissance et stationnaire alors que le VX n'est dégradé qu'en phase exponentielle. La vitesse de dégradation biologique du déméton-S-méthyl diminue avec l'augmentation de la concentration d'extrait de levure ou de phosphate alors que le phénomène inverse est observé avec le VX. Le déméton-S-méthyl est biotransformé par rupture du groupement S-C alors que *Corynebacterium glutamicum* agit sur le VX en clivant la liaison P-S. *Corynebacterium glutamicum* et *Corynebacterium petrophilum* possèdent un potentiel à dégrader le déméton-S-méthyl et le VX mais il semble clair que les systèmes enzymatiques impliqués sont différents ou ne sont pas régulés de façon analogue.

3-5 Conclusions.

Les essais effectués ont permis de mettre en évidence la capacité de plusieurs micro-organismes (*Corynebacterium glutamicum*, *petrophilum*, *Alternaria tenuis*...) à dégrader biologiquement le VX en présence d'une source de carbone auxiliaire mais les vitesses de dégradation restent limitées à quelques $\mu\text{M}\cdot\text{h}^{-1}$. Parmi les micro-organismes testés, la famille des corynéformes semble particulièrement intéressantes car les 2 *Corynebacterium* testées sont capables de dégrader les 3 COP à liaison P-S. L'action de *Corynebacterium glutamicum* sur le VX présente un fort intérêt car la souche entraîne une détoxification de ce COP par rupture de la liaison P-S, a contrario *Corynebacterium glutamicum* biotransforme le déméton-S-méthyl par rupture de la liaison C-S, ce qui ne détoxifie pas le composé. *Corynebacterium glutamicum* est un bon candidat pour envisager la purification de l'enzyme responsable de la rupture de la liaison P-S. La dégradation biologique du VX par *Corynebacterium glutamicum* ou *petrophilum* est favorisée par la présence d'extrait de levure ou de peptones et de phosphate mais ces produits ne permettent pas la dégradation du VX par *Bacillus sphaericus*.

CHAPITRE 4 - DETERMINATION DE LA CAPACITE D'EXTRAITS EXO ET INTRA CELLULAIRES A DEGRADER BIOLOGIQUEMENT LE VX, LE DEMETON-S-METHYL ET LE TETRISO.

4 - 1 Introduction.

La prospection d'enzymes capables de détoxifier les COP agents de guerre a consisté principalement à rechercher et sélectionner des extraits protéiques (Defrank, 1991) obtenus à partir d'organismes eucaryotes ou procaryotes. L'utilisation de tels extraits est due principalement au fait que les équipes américaines (Mounter, 1953, 1955, 1956, 1965; Hoskin, 1964) qui ont initié l'utilisation d'enzymes pour détoxifier les COP, ont travaillé à partir d'organismes eucaryotes dont l'activité catalytique vis à vis des COP était recherchée à partir de broyats d'organe. Ainsi Hoskin (1984), Broomfield (1985) ont montré la possibilité de dégrader les agents G par des extraits tissulaires de cochon, rat, calmar... Lorsque les micro-organismes (Sethumathan *et al.*, 1973) ont commencé à être utilisés comme source potentielle d'enzymes, les équipes ont par habitude continué à travailler avec des extraits exo ou intracellulaires et non avec des micro-organismes en culture (Defrank, 1991). Les études relatives à l'utilisation d'extraits cellulaires pour dégrader le VX ont cependant apporté peu de résultats positifs malgré la quantité d'extraits eucaryotes ou procaryotes testés (Hoskin et Walker, 1997). En fait, seuls Fu et Sun (1989) et Bezeau (1996) ont indiqué la capacité d'extraits protéiques à dégrader le VX (extrait d'hépatocytes de rat et extrait intra cellulaire de *Rhodococcus opaccus*).

Les extraits exo-cellulaires sont constitués par le milieu extérieur (milieu de culture) et la matière organique dont les protéines secrétée par les micro-organismes. Les extraits intracellulaires correspondent aux molécules organiques (protéines, peptides ...) et minérales contenues dans l'espace cellulaire (périplasma et cytoplasme). Une enzyme peut être localisée dans le compartiment exo-cellulaire ou dans l'espace intracellulaire. Les extraits intra et exo-cellulaires sont obtenus en séparant, après culture, les cellules du milieu de culture par centrifugation ou par micro-filtration. Le surnageant (centrifugation) ou le filtrat (micro-filtration) correspond à l'extrait exo-cellulaire dont la préparation ne demande pas d'opérations supplémentaires si ce n'est l'ajustement au pH souhaité par l'intermédiaire d'un tampon. L'extrait intracellulaire est

obtenu après lyse du culot de centrifugation ou du rétentat de micro-filtration, la lyse cellulaire pouvant être obtenue par différentes méthodes décrites par Whitte et Marcus (1988) : mécanique (agitation, ultrasons), physique (pression, dépression, choc osmotique ...), enzymatique (lysozyme), chimique (détergents).

Aucune de ces différentes méthodes n'est parfaite, l'idéal étant de trouver un bon compromis entre un rendement de lyse important et une préservation des protéines en évitant en particulier l'élévation de la température. Parmi ces méthodes, les lyses par voie enzymatique et par dépression nous ont paru intéressantes car elles paraissent peu traumatisantes pour les protéines. Nous les avons retenues pour préparer nos extraits.

L'utilisation d'extraits cellulaires, pour dégrader un xénobiotique par voie biologique, demande l'emploi de témoins abiotiques adaptés. Plusieurs types de témoins abiotiques sont utilisables. Bezeau (1996) étudiait la dégradation abiotique du VX dans un extrait dénaturé par chauffage. Bonierbale *et al.* (1996) suivaient la dégradation physico-chimique du xénobiotique dans un extrait déprotéiné par ultra-filtration. D'autres témoins abiotiques sont cependant utilisables :

- le milieu de culture ayant servi à la culture du micro-organisme stérilisé par micro-filtration ou autoclavage peut être le témoin abiotique d'un extrait exocellulaire,
- le tampon employé pour la préparation d'un extrait intracellulaire peut être utilisé comme témoin abiotique.

Parmi ces différents témoins abiotiques aucun n'est toutefois satisfaisant à 100 %. L'utilisation d'un tampon ne permet pas de suivre la dégradation abiotique en milieu minéral, l'ultra-filtration peut éliminer certaines protéines à l'origine de la sorption du xénobiotique, la dénaturation par chauffage peut créer des phénomènes de floculation qui vont modifier l'homogénéité de l'extrait.

Compte tenu des défauts que présentent les différents témoins abiotiques, nous avons essayé d'utiliser lors de nos expérimentations au moins 2 témoins abiotiques parmi lesquels des extraits dénaturés par autoclavage, des extraits déprotéinés par ultrafiltration ou des tampons.

Dans le cadre de notre étude, nous avons utilisé des extraits exo et intracellulaires provenant des micro-organismes qui en culture pure laissaient entrevoir

une capacité à dégrader le VX, à savoir : *Alternaria tenuis*, *Bacillus sphaericus*, *Corynebacterium glutamicum* et *Rhodococcus opaccus*.

Le but principal des essais avec les extraits cellulaires est de :

- confirmer l'existence d'une dégradation biologique du VX et le choix de *Corynebacterium glutamicum* pour purifier un enzyme,
- localiser (exo ou intra) la ou les enzymes capables de dégrader le VX, en vue de leur purification,
- déterminer l'effet de la concentration du phosphate sur l'activité des extraits provenant de *Corynebacterium glutamicum*.

Les expérimentations ont consisté :

- à cultiver les micro-organismes sur milieu nutritif sans COP,
- à préparer les extraits, à tester leur capacité à dégrader biologiquement le VX,
- à déterminer et comparer l'activité d'un extrait intracellulaire provenant de *Corynebacterium glutamicum* vis à vis du VX, du déméton-S-méthyl et du tétriso.

4 - 2 **Matériels et méthodes.**

4 - 2 - 1 Matériel chimique

Les différents COP (VX, déméton-S-méthyl, tétriso et malathion) ont été utilisés comme décrit au chapitre 2 paragraphe 2-2-1.

4 - 2 - 2 Matériel biologique

Pour la préparation des extraits protéiques, nous avons utilisé les micro-organismes : *Alternaria tenuis*, *Bacillus sphaericus*, *Corynebacterium glutamicum* et *Rhodococcus opaccus* dont les références sont données Tableau 10, paragraphe 3-2-2.

4 - 2 - 3 Préparation des extraits cellulaires

Les extraits ont été préparés à partir de cultures effectuées sur des milieux nutritifs en absence de COP. Les milieux de culture suivants (composition donnée paragraphe 2-2-2) ont été utilisés :

-a) pour la culture des bactéries : milieu BTS ou milieu minéral nutritif complet (extrait de levure ou peptone : 1 ou 5 g.L⁻¹, fructose ou glucose à 5 ou 10 g.L⁻¹, tampon phosphate entre 15 et 70 g.L⁻¹),

-c) pour la culture de *Alternaria tenuis* : milieu Czapek .

Les cultures ont été effectuées en erlenmeyers (volume 2 L) comme décrit au chapitre 3 paragraphe 3-2-2 et conduites à l'obscurité à 28°C sous une agitation de 200rpm.

Après culture lorsque la DO atteint une valeur comprise entre 4 et 5 (phase exponentielle de croissance) à 600 nm, le milieu est :

soit centrifugé dans des pots de 50 ml à 10000g, 10 minutes et à 4 °C (Centrifugeuse MR22i – Jouan). Les surnageants de centrifugation sont mélangés et constituent l'extrait exo-cellulaire. Les culots sont repris dans du tampon tris/HCl 20 mM à pH compris entre 7,5 et 8 (volume final d'environ 20 ml), lorsque cela est nécessaire les extraits exo-cellulaires et les culots sont conservés à –80°C,

soit filtré à l'aide d'une cassette à flux tangentiel (ultraset – Gelman) équipée d'une membrane de 0,16 µm, la micro-filtration permet de concentrer les cellules dans un volume de 60 ml environ (rétentat), le filtrat constitue l'extrait exo-cellulaire. Après concentration le rétentat est centrifugé dans 2 pots de 50 ml à 10000 g, 10 minutes et à 4 °C (Centrifugeuse MR22i – Jouan). Les culots sont repris dans du tampon tris/HCl 20 mM à pH compris entre 7.5 et 8 dans un volume total d'environ 20 ml. Lorsque cela est nécessaire l'extrait exo cellulaire et les culots sont conservés à –80°C.

La lyse des cellules est effectuée soit par dépression soit par voie enzymatique.

La lyse par dépression est effectuée dans une chambre en inox (Kontes) de capacité utile de 25 ml. Les cellules sont déposées dans la chambre. Cette dernière est pressurisée à 6 bars par de l'azote. L'azote pénètre dans les cellules sous l'effet de la pression. Après 45 minutes de contact à 4°C, la chambre est mise en dépression, ce qui entraîne une vaporisation de l'azote hors des cellules et une fuite du contenu cellulaire vers le milieu extérieur. Après la lyse, le milieu est centrifugé 45 minutes à 15000 g et à 4°C. Après centrifugation, les culots renfermant les débris cellulaires sont éliminés, les surnageants qui constituent l'extrait intracellulaire sont mélangés. Le pH est mesuré (pH mètre Tacussel PHN850) et ajusté entre 7.5 et 8 si nécessaire. L'extrait intracellulaire est filtré sur membrane 0.22 µm et conservé à –80°C jusqu'à utilisation. La lyse par dépression permet d'obtenir des protéines péri et cytoplasmiques.

La lyse enzymatique s'effectue avec l'enzyme lysozyme (Sigma) sur des cellules reprises en tampon tris/HCl 20 mM pH 8 après culture. Le lysozyme a la propriété de catalyser l'hydrolyse des liaisons β 1-4 glycosidiques des peptidoglycanes et permet la libération des protéines périplasmiques (gram -), liées à la paroi (gram +) et cytoplasmiques dans le milieu extérieur. La quantité de lysozyme nécessaire pour effectuer la lyse cellulaire est de 100 mg d'enzyme pour une DO à 600 nm égale à 1 et pour 1 L de cellules (Harris, 1989). Après ajout de la quantité utile de lysozyme, les cellules sont agitées 30 secondes avec un vortex pour bien homogénéiser l'enzyme et les cellules. Le mélange cellules/enzyme est ensuite incubé pendant 45 minutes à 37°C. Toutes les 10 minutes le milieu réactionnel est agité au vortex, le pH est vérifié et en cas d'acidification réajusté à 8 par ajout de potasse ou de soude 3N. Après 45 minutes d'exposition au lysozyme, les cellules sont centrifugées 45 minutes à 15000g et 4°C pour éliminer les débris cellulaires et les cellules non lysées. Les surnageants de centrifugation sont mélangés et constituent l'extrait intracellulaire. Le pH est vérifié et réajusté à 7.5/8 si nécessaire. L'extrait est ensuite filtré sur une membrane de 0.22 μ m de porosité et conservé à -80°C jusqu'à utilisation.

La concentration protéique des extraits est déterminée soit :

- par la mesure de l'absorbance de l'extrait à 260 et 280 nm et application de l'équation de Warburg et Christian (1941) : $1.55 \times \text{Abs à } 280 \text{ nm} - 0.76 \times \text{Abs à } 260 \text{ nm} = \text{concentration en protéines en g.L}^{-1}$,

- par la méthode de Folin et Lowry (kit Sigma « protein assay kit n° 5656 , la Bovine Sérum Albumine (BSA) étant employée en tant que protéine étalon.

4 - 2 - 4 Détermination de la dégradation biologique du VX, du déméton-S-méthyl et du tétriso par les extraits cellulaires.

La détermination de la dégradation des 3 COP s'effectue par CPG ou /et par la méthode d'Ellman. Pour la CPG, les essais sont conduits en flacon de verre stérile de volume de 20 ml contenant 10 ml d'extrait protéique et le COP à la concentration finale de 0.05 ou 0,5 g.L⁻¹. Les flacons sont incubés en condition statique en étuve à 28°C. Le pH et le taux de COP sont suivis en fonction du temps. Le pH est mesuré comme décrit au chapitre 3 paragraphe 3-2-3. Le taux de COP est suivi par CPG comme décrit au chapitre 2 paragraphe 2-2-3-1. L'extraction s'effectue sur un aliquote de 1ml de milieu

biologique lorsque la concentration de COP initiale est égale à 0.05 g.L^{-1} et sur un aliquote de 1 ml d'extrait protéique dilué au 1/10 en tampon Tris/HCl 20mM pH8 lorsque la concentration initiale en COP est égale à $0,5 \text{ g.L}^{-1}$. Chaque essai est effectué en double et pour chaque duplicat 2 extractions sont effectuées. Les résultats sont exprimés en μM de COP dégradées par heure.

Avec la méthode d'Ellman, Les essais s'effectue en mini-cuve comme décrit au paragraphe 2-2-3-2. Quatre séries de deux cuves sont employées :

- série essai (E) = extrait protéique + COP + DTNB
- série témoin réduction spontanée du DTNB dans l'extrait (T-DTNB) = extrait protéique + DTNB
- série hydrolyse spontanée du COP (T-COP) = milieu abiotique + DTNB + COP,
- série réduction spontanée du DTNB dans le témoin abiotique = milieu abiotique + DTNB.

La vitesse de réduction du DTNB à 412 nm est mesurée dans les quatre séries de cuves. La vitesse d'hydrolyse biologique du COP correspond à la vitesse d'hydrolyse de la série E déduite des vitesses de réduction du DTNB des séries T-DTNB et T-COP. La série réduction spontanée du DTNB permet de suivre aussi les marquages de thiols dus à l'extrait protéique. En appliquant la loi de Beer-Lambert, la concentration de COP hydrolysé est déterminée.

4 - 2 - 5 Témoins abiotiques.

Les témoins abiotiques suivants ont été utilisés :

- tampon Tris/HCl 20 mM à pH compris entre 7.5 et 8 : témoin extraits exo et intracellulaires,
- milieu de culture stérile : témoin extraits exo-cellulaires,
- extraits déprotéinés par ultra-filtration (cellule Amicon ou tube Centriprep ou Centricon) sur membrane de 10 kD : témoin extraits exo et intracellulaires,
- extraits dénaturés par chauffage (30 minutes à ébullition) ou autoclavage (120 °C pendant 20 minutes) : témoin extraits exo et intracellulaires.

4-3 RESULTATS EXPERIMENTAUX

4-3-1 Comparaison de la capacité à biodégrader le VX des extraits provenant de *Alternaria tenuis*, *Bacillus sphaericus*, *Corynebacterium glutamicum* et *Rhodococcus opaccus*.

L'objectif est de mesurer et comparer la capacité à dégrader le VX des différents extraits intra et exo cellulaires obtenus par lyse par dépression ou par voie enzymatique.

4-3-1-1 Protocole

Après culture sur milieu minéral nutritif (décrit paragraphe 2-2-2) sans VX, les micro-organismes sont séparés du milieu de culture par centrifugation (10000g, 10min à 4°C). Les surnageants correspondent aux extraits exo cellulaires, les micro-organismes sont lysés par voie mécanique ou enzymatique, les lysats correspondent aux extraits intracellulaires. La vitesse de dégradation du VX en présence des différents extraits ou en conditions abiotiques est suivie par CPG et/ou par la méthode d'Ellman (cf. paragraphe 4-2-4). Les témoins abiotiques sont constitués de tampons ou d'extraits déprotéinés par ultra-filtration ou par chauffage (cf. paragraphe 4-2-5).

4-3-1-2 Résultats.

Les vitesses de disparition du VX en présence des différents extraits testés sont mentionnées dans le Tableau 18. Les vitesses de dégradation biologique déterminées par la méthode d'Ellman tiennent compte de la réduction du DTNB non due à l'hydrolyse de la liaison P-S du VX (témoin extrait protéique + DTNB sans VX). La vitesse de dégradation du VX est supérieure en conditions biologiques qu'en conditions abiotiques avec les extraits intra cellulaire de *Corynebacterium glutamicum* et les extraits intra et exo-cellulaires d'*Alternaria tenuis*, pour les autres extraits les vitesses sont équivalentes. La vitesse de disparition la plus élevée est observée avec l'extrait intra cellulaire de *Corynebacterium glutamicum*. Les trois extraits entraînent une rupture de la liaison P-S du VX (mise en évidence par la méthode d'Ellman). L'activité spécifique ($\mu\text{M.h}^{-1}.\text{mg}^{-1}$) des extraits n'a pas été calculée car les extraits obtenus par lyse par voie enzymatique contiennent du lysozyme qui est pris en compte lors du dosage protéique et surévalue la quantité de protéines endogènes. Les extraits de *Bacillus sphaericus* et *Rhodococcus*

opaccus ne présentent aucune capacité à dégrader biologiquement le VX dans les conditions opératoires utilisés.

Tableau 18 : Vitesse (V_i en $\mu\text{M.h}^{-1}$) de disparition du VX en présence des différents extraits biologiques et en conditions abiotiques.

Origine de l'extrait	Type de lyse	Protéines (g.L^{-1})	Méthode d'essai	V_i 1 ($\mu\text{M.h}^{-1}$) en présence d'extrait	Témoin abiotique	V_i 2 ($\mu\text{M.h}^{-1}$) abiotique	V_i biologique (V_i 1- V_i 2) ($\mu\text{M.h}^{-1}$)
Exo ⁽¹⁾ Al t ⁽²⁾		2,5	CPG	2,8 \pm 0,2	Extrait	0,8 \pm 0,05	2
				2 \pm 0,15	déprotéiné	0,5 \pm 0,05	1,5
Intra ⁽³⁾ Al t	Pression	1,1	CPG	3,5 \pm 0,2	Extrait	1,8 \pm 0,1	1,7
			Ellman	4,4 \pm 0,2	déprotéiné	2 \pm 0,1	2,2
Exo Ro ⁽⁴⁾		0,15	CPG	1 \pm 0,05	Extrait	0,8 \pm 0,05	0,2
			Elman	0,85 \pm 0,05	déprotéiné	0,55 \pm 0,05	0,3
Intra Ro	Pression	1,8	CPG	2,1 \pm 0,15	Extrait déprotéiné	2 \pm 0,1	0,1
Exo Bsph ⁽⁵⁾			CPG	0,5 \pm 0,02	Extrait déprotéiné	0,5 \pm 0,05	0
Intra Bsph	Enzymatique	3,7	Ellman	2,1 \pm 0,1	Tampon tris	1,5 \pm 0,1	0,6
Exo Cg ⁽⁶⁾		3,5	CPG	2,9 \pm 0,1	Extrait	1,8 \pm 0,1	0,9
			Ellman	2,5 \pm 0,1	déprotéiné	1,5 \pm 0,1	1
Intra Cg ⁽⁶⁾	Enzymatique	1,15	CPG	7,2 \pm 0,3	Extrait	1,7 \pm 0,1	5,5 \pm 0,3
			Ellman	9,4 \pm 0,4	déprotéiné	1,8 \pm 0,1	7,6 \pm 0,4
	Pression	0,11	CPG	6,8 \pm 0,3	Extrait	1,3 \pm 0,05	5,5 \pm 0,2
			Ellman	7 \pm 0,3	autoclavé	1,8 \pm 0,07	5,2 \pm 0,4

⁽¹⁾extrait exo-cellulaire ⁽²⁾*Alternaria tenuis* ⁽³⁾extrait intra cellulaire ⁽⁴⁾*Rhodococcus opacus* ⁽⁵⁾*Bacillus sphaericus* ⁽⁶⁾*Corynebacterium glutamicum*.

4-3-2 Effet de la concentration du tampon phosphate et de la méthode de lyse sur la dégradation biologique du VX par des extraits intracellulaires de *Corynebacterium glutamicum*.

L'objectif est d'évaluer si la concentration en tampon phosphate du milieu de culture ayant servi à la production des bactéries et la méthode de lyse utilisée ont une incidence sur la dégradation (vitesse) biologique du VX par les extraits intracellulaires de *Corynebacterium glutamicum*

4-3-2-1 Protocole

Des cultures de *Corynebacterium glutamicum* ont été conduites en milieu minéral nutritif (glucose et extrait de levure 5 g.L⁻¹) contenant des concentrations de tampon phosphate comprises entre 15 et 70 g.L⁻¹. Un extrait intracellulaire provenant de chaque culture est préparé par lyse par dépression et par voie enzymatique. La capacité de chaque extrait à dégrader le VX est ensuite évaluée par la méthode d'Ellman, les vitesses de dégradation du VX sont comparées en fonction du type de lyse et de la concentration en tampon phosphate. L'activité spécifique qui correspond à la concentration de VX (µM) dégradé biologiquement par unité de temps (heure) et quantité de protéines(mg) présentes dans le milieu d'essai n'a pu être pris comme élément de comparaison car les extraits lysés par voie enzymatique contiennent du lysozyme qui est comptabilisé par la méthode de dosage protéique.

Les témoins abiotiques sont constitués par des extraits ultrafiltrés sur membrane de 10 kD.

4-3-2-2 Résultats

Les vitesses de disparition du VX en présence des extraits et en conditions abiotiques font l'objet du tableau 19. Les vitesses de dégradation biologique déterminées par la méthode d'Ellman tiennent compte de la réduction du DTNB non due à l'hydrolyse de la liaison P-S du VX (témoin extrait protéique + DTNB sans VX).

Il apparaît que le VX est dégradé par les différents extraits intracellulaires de *Corynebacterium glutamicum* obtenus à la fois par lyse sous pression et par voie enzymatique. La vitesse de dégradation biologique du VX augmente avec la concentration en tampon phosphate du milieu de culture quel que soit le mode de lyse

cellulaire. Pour une même concentration en tampon phosphate, la vitesse de dégradation biologique du VX est toujours plus forte lorsque la lyse a été effectuée par voie enzymatique.

Tableau 19 : Concentration protéique, vitesses de disparition du VX (en conditions abiotique et en présence de l'extrait intracellulaire de *Corynebacterium glutamicum*) et activités spécifiques des différents extraits en fonction de la concentration en tampon phosphate (Tp P) du milieu de culture.

Tp P (g.L ⁻¹) du milieu de culture	Type de lyse	Concentration protéique (g.L ⁻¹) des extraits	Vi 1 (μM.h ⁻¹) en présence des extraits	Vi 2 (μM.h ⁻¹) abiotique	Vi biologique (Vi 1-Vi 2) (μM.h ⁻¹)	Activité spécifique (μM.h ⁻¹ mg ⁻¹)
15	Enzymatique	1,05	6,4 ± 0,3	1,8 ± 0,1	4,6	4,7
	Pression	0,13	5 ± 0,3	2 ± 0,2	3	24,5
20	Enzymatique	1,1	10 ± 0,4	3 ± 0,1	7	6,8
	Pression	0,15	7 ± 0,2	2,2 ± 0,1	4,8	34
25	Enzymatique	1	12 ± 0,2	3 ± 0,1	8,2	8,7
40	Enzymatique	1,6	26 ± 0,7	7,7 ± 0,2	18,3	12,2
	Pression	0,26	18 ± 0,6	5,4 ± 0,2	12,6	51,5
70	Enzymatique	2,2	29 ± 0,7	8 ± 0,2	21	10,15
	Pression	0,37	26 ± 0,5	7,2 ± 0,2	18,8	54

4-3-3 Comparaison de la capacité des extraits intra cellulaires de *Corynebacterium glutamicum* à dégrader le VX, déméton-S-méthyl et tétriso.

L'objectif est de déterminer si les extraits intra cellulaires de *Corynebacterium glutamicum* sont capables de dégrader les 3 COP à liaisons P-S.

4-3-3-1 Protocole

Les vitesses de dégradation du VX, du tétriso et du déméton-S-méthyl ($C_i = 0.5 \text{ g.L}^{-1}$) par un extrait préparé à partir d'une culture en milieu minéral nutritif avec 15 g.L^{-1} de tampon phosphate et lysé par voie enzymatique ont été mesurées par la méthode d'Ellman à 28°C et pH 8.

4-3-3-2 Résultats

Les vitesses de disparition des 3 COP sont présentées tableau 18. Les vitesses de disparition du VX d'origine biologique déterminées par la méthode d'Ellman tiennent compte de la réduction du DTNB non due à l'hydrolyse de la liaison P-S du VX (témoin extrait protéique + DTNB sans VX). L'extrait intra cellulaire de *Corynebacterium glutamicum* est capable de dégrader biologiquement les trois COP à liaison P-S. La vitesse de dégradation biologique la plus forte est obtenue avec le tétriso puis avec le VX. Le déméton-S-méthyl est le composé qui présente les vitesses de dégradation biologique et abiotiques les plus faibles. L'activité spécifique de l'extrait pour les 3 composés organophosphorés est donnée à titre indicatif dans le tableau 20.

Tableau 20 : Vitesses de disparition (conditions abiotique et biologique) du VX, déméton-S-méthyl et tétriso et activités spécifiques d'un extrait intra cellulaire de *Corynebacterium glutamicum* (Méthode d'Ellman. pH 8 et 28°C).

COP ($0,5 \text{ g.L}^{-1}$)	Concentration protéique (g.L^{-1}) de l'extrait	Vi 1 ($\mu\text{M.h}^{-1}$) en présence de l'extrait	Vi 2 ($\mu\text{M.h}^{-1}$) abiotique	Vi biologique (Vi 1-Vi.2) ($\mu\text{M.h}^{-1}$)	Activité spécifique ($\mu\text{M.h}^{-1}\text{mg}^{-1}$)
VX	1,17	$5,4 \pm 0,25$	$1,6 \pm 0,1$	3,8	3,9
Tétriso	1,17	$6,6 \pm 0,2$	$1 \pm 0,05$	5,6	5,1
Déméton-S- méthyl	1,17	$2 \pm 0,1$	$0,1 \pm 0,05$	1,9	1,7

4-4 DISCUSSION

4-4-1 Comparaison de la capacité des extraits cellulaires à dégrader le VX.

Parmi les extraits exo et intra cellulaires testés, les extraits intra cellulaires provenant de deux micro-organismes (*Corynebacterium glutamicum* et *Alternaria tenuis*) sont capables de dégrader biologiquement le VX. Ces résultats confirment ceux acquis lors des essais avec les micro-organismes en culture pure. Les extraits provenant de *Corynebacterium glutamicum* présentent une activité spécifique supérieure aux extraits d'*Alternaria tenuis*. Il faut noter que l'activité d'hydrolyse du VX de l'extrait provenant de *Corynebacterium glutamicum* augmente avec la concentration en tampon phosphate du milieu de culture de la bactérie. L'effet du phosphate sur l'activité catalytique de l'OPH, seule enzyme décrite dans la littérature pour sa capacité à hydrolyser la liaison P-S, n'a jamais été reporté.

Les activités spécifiques d'hydrolyse de la liaison P-S d'un extrait intra cellulaire de *Corynebacterium glutamicum* (lyse enzymatique) sont de l'ordre de $3,9 \mu\text{M}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ pour le VX, de 5,1 pour le tétriso et de 1,7 pour le déméton-S-méthyl. Hoskin *et al.* (1999) ont obtenu, à partir d'extraits bactériens de *Pseudomonas diminuta* (souche productrice d'OPH) lysée par sonication, des activités spécifiques de l'ordre de $0,02 \mu\text{M}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ pour le tétriso et de $0,005 \mu\text{M}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ pour le déméton-S. La confrontation des valeurs obtenues par Hoskin *et al.* (1999) avec celles déterminées dans notre travail montre que *Corynebacterium glutamicum* est une bactérie très intéressante comme source d'enzymes capables d'hydrolyser la liaison P-S.

Les extraits provenant de *Rhodococcus opaccus* et *Bacillus sphaericus* ne présentent pas de capacité biologique à dégrader le VX. Bezeau (1996) avait pourtant observé une dégradation du VX en présence d'un extrait exo cellulaire de *Rhodococcus opaccus* mais l'extrait avait été concentré par ultrafiltration. Les résultats relatifs à *Rhodococcus opaccus* suggèrent que la bactérie synthétise un système enzymatique capable de dégrader le VX mais la quantité d'enzymes produites paraît très faible et est incompatible avec une purification protéique, à moins d'employer un équipement et des colonnes très spécifiques. Que ce soit en culture pure ou sous la forme d'extraits exo ou intracellulaires, *Bacillus sphaericus* n'a démontré aucune capacité à dégrader le VX.

Bezeau (1996) avait pourtant indiqué que cette bactérie était capable de dégrader le VX. La comparaison des conditions opératoires utilisées par Bezeau (1996) et lors de ce travail suggère que *Bacillus sphaericus* puisse posséder un système enzymatique capable de dégrader le VX de nature inductive et non constitutive.

4-4-2 Localisation du système enzymatique de *Corynebacterium glutamicum* capable de dégrader biologiquement le VX, le tétriso et le déméton-S-méthyl.

Une dégradation biologique du VX, du tétriso et du déméton-S-méthyl est constatée en présence de l'extrait intra cellulaire de *Corynebacterium glutamicum*, la dégradation biologique de ces trois COP par la bactérie est d'origine intra cellulaire. Les extraits intra cellulaires de *Corynebacterium glutamicum* sont capables de dégrader le VX indépendamment de la méthode de lyse. La lyse par dépression agit sur la paroi et la membrane cytoplasmique et permet de libérer tout le contenu intra cellulaire. La lyse par le lysosome a pour effet de dégrader le peptidoglycane de la paroi, fragilisant ainsi les bactéries qui peuvent éclater sous l'effet d'un choc osmotique. Le procédé de lyse par voie enzymatique utilisé ne comporte pas d'étape de choc osmotique spécifique, le tampon de lyse assurant une certaine pression osmotique. La lyse par voie enzymatique libère surtout les protéines présentes dans la paroi qui est composée chez *Corynebacterium glutamicum* de 3 parties : membrane externe, espace translucide en microscopie électronique et peptidoglycane (Marienfield *et al.*, 1997). L'enzyme entraînant l'hydrolyse de la liaison P-S du VX pourrait être une enzyme liée à la paroi ou intra cellulaire.

Le système enzymatique synthétisé par *Corynebacterium glutamicum* est constitutif car il ne nécessite pas la présence du COP pour être synthétisé, ce que confirment Girbal *et al.*, (2000) qui relatent que la dégradation biologique du déméton-S-méthyl par *Corynebacterium glutamicum* en culture ne nécessite pas de temps d'induction. L'OPH, seule enzyme décrite pour sa capacité à hydrolyser la liaison P-S, est aussi une enzyme constitutive (Dumas *et al.*, 1988). Cependant l'OPH est une protéine membranaire (Defranck, 1991), ce qui n'est pas le cas du système enzymatique détecté dans notre recherche. Le système enzymatique de *Corynebacterium glutamicum* ne serait pas une OPH.

4-4-3 Comparaison de la dégradation biologique du VX, du tétriso et du déméton-S-méthyl par l'extrait intracellulaire de *Corynebacterium glutamicum*.

Les trois COP sont dégradés par l'extrait mais la vitesse de dégradation du tétriso est plus grande que celle du VX et du déméton-S-méthyl. Le tétriso apparaît plus facilement biodégradable que le VX et le déméton-S-méthyl, ce qui a déjà constaté par Hoskin *et al.*, en 1995 lors d'essais avec l'OPH, et en 1999 lors d'essais avec des extraits de *Pseudomonas diminuta*. Le déméton-S-méthyl est le COP qui est le moins biodégradé par l'extrait intra cellulaire de *Corynebacterium glutamicum*, par contre lors des essais avec la bactérie en culture le déméton-S-méthyl est apparu le COP dont la vitesse de dégradation en présence de *Corynebacterium glutamicum* était la plus forte. Il se pourrait que la dégradation biologique du déméton-S-méthyl et du VX ne soit pas régie par les mêmes mécanismes ou ne soit pas due aux mêmes systèmes enzymatiques.

4-5 CONCLUSIONS

Parmi les extraits cellulaires testés, ceux provenant de *Corynebacterium glutamicum* et d'*Alternaria tenuis* présentent une capacité à dégrader biologiquement le VX, *Corynebacterium glutamicum* est le micro-organisme le plus intéressant pour biodégrader cet organophosphoré.

Les différents essais effectués ont permis de localiser dans le compartiment intracellulaire, le système enzymatique de *Corynebacterium glutamicum* actif sur le VX, sa synthèse étant constitutive,.

L'extrait de *Corynebacterium glutamicum* est aussi capable de dégrader le tétriso et à moindre titre le déméton-S-méthyl.

L'extrait intra cellulaire de *Corynebacterium glutamicum* obtenu par lyse de la bactérie par voie enzymatique en présence de lysozyme est un bon candidat pour effectuer une purification du système enzymatique capable de dégrader le VX.

CHAPITRE 5 - PURIFICATION D'UNE ENZYME CAPABLE D'HYDROLYSER LE VX

5-1 Introduction

La purification d'une protéine d'intérêt incluse dans un mélange biologique (protéines, peptides, acides nucléiques...) nécessite la séparation de cette protéine des autres constituants du mélange. Le principe de purification d'une molécule biologique consiste à utiliser les caractéristiques physico-chimiques (solubilité, charges, taille, forme, polarité, stabilité...) propres à chaque constituant du mélange pour les séparer les uns des autres (Harris et Angal, 1989) et isoler la molécule recherchée. En règle générale, en fonction des différentes caractéristiques physico-chimiques, plusieurs techniques sont nécessaires (Harris et Angal, 1989) :

-solubilité : précipitation aux sels (exemple sulfate d'ammonium),

-charges : chromatographie liquide sur colonnes échangeuses d'ions (anions ou cations),

- taille, forme : - chromatographie liquide sur colonnes de type gel ou billes où les protéines migrent plus ou moins rapidement en fonction de leur taille ou de leur forme,

- ultrafiltration où une membrane laisse diffuser les molécules de taille inférieure à sa porosité et retient les molécules de taille supérieure,

-polarité : chromatographie liquide sur colonnes hydrophobes et de phase inverse,

-stabilité : certaines molécules tels les acides nucléiques peuvent être éliminées du mélange biologique sous l'action d'enzymes spécifiques, des protéines peuvent être éliminées du mélange par chauffage ou traitement acido-basique,

-activité : chromatographie liquide d'affinité (exemple réaction antigènes-anticorps).

Il apparaît que la purification d'une protéine dont les caractéristiques physico-chimiques sont inconnues demande beaucoup de tâtonnements et de mises au point pour arriver à définir les différentes étapes de purification. A titre d'exemple, les étapes de purification des enzymes OPH (Dumas *et al.* 1989) et OPAA (Defrank et Cheng, 1991) incluent des passages sur colonnes échangeuses d'ions (séparation par la charge), phase reverse (séparation sur le caractère hydrophobe) et gel filtration (séparation sur la taille).

Lors de notre travail, nous avons purifié un système enzymatique provenant d'un extrait intra cellulaire de *Corynebacterium glutamicum*.

Pour la purification de cette enzyme, nous avons utilisé un procédé en trois étapes :

- chromatographie liquide sur une colonne Q Sépharose Fast Flow (Pharmacia) permettant une séparation sur la charge,
- ultrafiltration sur membrane de seuil de coupure de 10 kD (séparation sur la taille),
- chromatographie liquide sur une colonne S300 (Pharmacia) permettant une séparation sur la taille,

Au cours de la purification nous avons utilisé la méthode d'Ellman pour sélectionner les fractions protéiques qui présentaient une activité catalytique sur l'hydrolyse du VX et/ou du tétriso, car cette méthode est plus rapide que la CPG et est spécifique de la rupture de la liaison P-S. Nous avons appelé arbitrairement VXase le système enzymatique purifié. Nous avons commencé sa caractérisation (poids moléculaire, constantes...) et examiné ses constantes cinétiques vis à vis du VX, à but de comparaison avec l'OPH.

Parallèlement à ce travail nous avons purifié la dipeptidase de *Lactobacillus sake* en se basant sur le protocole décrit par Montel *et al.* (1994). L'objectif étant de déterminer si cette enzyme présentant des homologues de séquences d'acides aminés avec certaines OPAA, est capable de catalyser l'hydrolyse de la liaison P-S du VX.

5-2 Matériels et méthodes

5-2-1 Matériel chimique

Les différents COP (VX, tétriso) ont été utilisés comme décrit au chapitre 2 paragraphe 2-2- 1. Le paraoxon (référence C158500) a été fourni par la société Clouzeau, une solution à 10 g.L⁻¹ a été préparée comme décrit au paragraphe 2-2-1 pour le déméton-S-méthyl.

5-2-2 Matériel biologique

Les purifications protéiques ont été effectuées à partir d'extraits intra cellulaires de *Lactobacillus sake* L111 et *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13745.

5-2-3 Préparation des extraits protéiques

Les extraits protéiques ont été préparés à partir de culture effectuée sur des milieu nutritifs en absence de COP. Les milieux de culture suivants (composition donnée paragraphe 2-2-2) ont été utilisés :

-a) milieu minéral complet (extrait de levure ou peptone à 1 ou 5 g.L⁻¹, fructose ou glucose à 5 ou 10 g.L⁻¹, tampon phosphate 20 g.L⁻¹) pour la culture de *Corynebacterium glutamicum*,

-b) milieu de Niven pour la culture de *Lactobacillus sake*.

5-2-3-1 Conditions de culture

Les cultures ont été effectuées en erlenmeyeurs (volume 2 L) comme décrit au paragraphe 3-2-2 et conduites à l'obscurité à 28°C sous une agitation de 200 rpm pour *Corynebacterium glutamicum* et sans agitation pour *Lactobacillus sake* .

5-2-3-2 Lyse cellulaire

Les deux systèmes protéiques recherchés étant intra cellulaires nous avons été amenés à préparer des extraits intra cellulaires des deux bactéries. Les procédés utilisés pour la lyse sont ceux décrits au paragraphe 4 – 2 – 3. Pour séparer les cellules du milieu de culture nous avons utilisé la technique de centrifugation pour *Lactobacillus sake* et la technique de microfiltration pour *Corynebacterium glutamicum*.

5-2-4 Dosage protéique

La concentration protéique des extraits a été déterminée soit :

- en mesurant la DO des extraits à 260 et 280 nm et en appliquant la relation suivante (équation de Christian et Walburg) : $1.55 \times \text{DO à } 280 \text{ nm} - 0.76 \times \text{DO à } 260 \text{ nm} = \text{concentration en protéines en g.L}^{-1}$,

- en utilisant la méthode de Folin et Lowry (kit Sigma « protein assay kit n° P5656 ») ,

la Bovine Sérum Albumine (BSA) étant employée en tant que protéine étalon.

5-2-5 Détermination de l'activité catalytique des extraits protéiques vis à vis des COP

Les cinétiques d'hydrolyse du VX et/ou du Tétriso (rupture liaison P-S) en présence des solutions protéiques ont été déterminées par la méthode d'Ellman en tampon tris/HCl 20 mM, pH 8, à 28°C. La méthode utilisée est celle décrite au paragraphes 4-2-7. Les constantes cinétiques des réactions enzymatiques ont été calculées en utilisant la méthode de Lineweaver-Burk.

5-2-6 Témoins abiotiques.

Les témoins abiotiques suivants ont été utilisés :

- tampon tris/HCl 20 mM à pH compris entre 7.5 et 8,
- tampon PBS de composition suivante : NaCl : 8 g.L⁻¹, KCl : 0.2 g.L⁻¹, Na₂HPO₄ : 1.15 g.L⁻¹, KH₂PO₄ 0.2 g.L⁻¹, CaCl₂ : 0.13 g.L⁻¹,
- extraits protéiques déprotéinés par ultra-filtration (cellule Amicon ou tube Centriprep ou Centricon) sur membrane de 10 kD,
- extraits protéiques dénaturés par autoclavage (120 °C pendant 20 minutes),
- tampons d'éluion : tris/HCl 20 mM + NaCl (gamme de concentration de 0 à 1 M).

5-2-7 Electrophorèse.

L'électrophorèses (séparation des protéines d'un mélange en fonction de leur poids moléculaire) permet de suivre l'aspect qualitatif des protéines d'un mélange protéique. Nous avons effectué des électrophorèses en conditions non dénaturantes (en présence de sodium dodecyl sulfate - SDS) et dénaturantes (en présence de SDS et β-mercaptoéthanol). Le rôle du SDS est de conférer la même charge aux protéines du mélange pour que la séparation s'effectue sur la taille et non sur la charge, le β-mercaptoéthanol a pour effet de cliver les ponts S-S inter et intra-protéique. Les électrophorèses ont été réalisées avec un appareil Phast System (Amersham Pharmacia Biotech) à partir de gels de polyacrilamide (Pharmacia) de 10 à 15 % révélés par coloration au bleu de Comassie (Pharmacia) ou au nitrate d'argent (Pharmacia). Les marqueurs de poids moléculaires utilisés lors des électrophorèses couvrent un gamme comprise entre 14 kD et 212 kD .

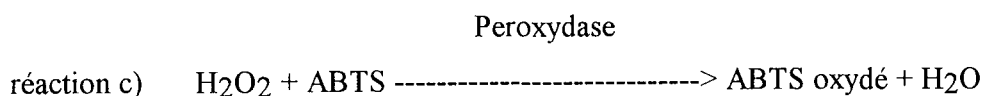
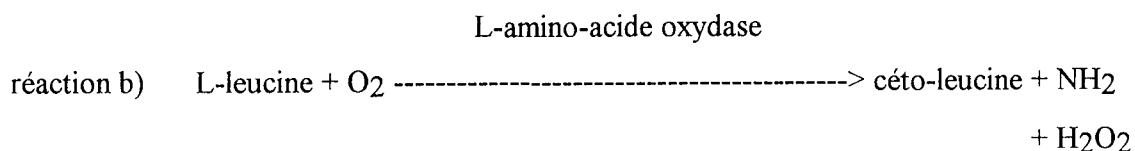
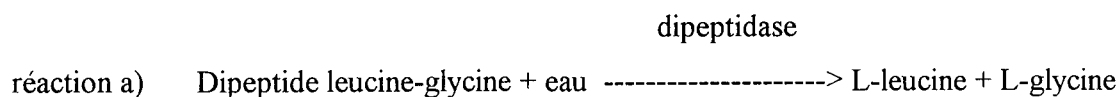
5-2-8 Purification de la dipeptidase.

5-2-8-1 Réactifs

Les différents réactifs utilisés pour la mesure de l'activité dipeptidasique proviennent de la société SIGMA, à savoir : leucine-glycine (noté Leu-gly - référence L-9625), L-amino-acide oxydase (LAO) sous forme d'extrait lyophilisé de venin de *Crotalus adamandeus* (référence A-9253), 2,2'azinobis(3-ethylbenzothiazolinesulfonic acide) (noté ABTS – référence A-1888), peroxydase purifiée à partir de Raifort (référence P-8375). Avant utilisation, l'ABTS, la peroxydase et la L-amino-acide oxydase sont mélangés dans de l'eau osmosée de façon à obtenir une concentration finale de 2,5 mg.ml⁻¹ de chaque produit.

5-2-8-2 Principe et mode opératoire.

L'activité dipeptidasique a été déterminée par la méthode de Lewis et Harris (1967) dont le schéma réactionnel est décrit ci-après :



L'ABTS oxydé absorbant à 420 nm, la réaction est suivie par spectrophotométrie avec un spectrophotomètre Pharmacia Ultrospec 3000 équipé d'un passeur de cuves thermostaté à 37°C par effet Peltier. La réaction est suivie pendant 2 min. Les tests de mesure de l'activité enzymatique s'effectuent en mini cuve, le mélange réactionnel étant le suivant : Tampon PBS + extrait protéique (800 µl), mélange ABTS/LAO/péroxydase (30 µl), Leu-gly (250 µl), avant l'ajout du substrat Leu-gly le milieu réactionnel est incubé 30 minutes à 37°C.

La cinétique de formation de l'ABTS oxydé est proportionnelle à la vitesse d'hydrolyse du dipeptide leu-gly. La vitesse d'hydrolyse du dipeptide leu-gly permet de calculer l'activité catalytique de l'extrait dipeptidasique.

Cette méthode est utilisée en cours de purification pour détecter les fractions protéiques possédant une activité dipeptidasique.

5-2-8-3 Purification de la dipeptidase de *Lactobacillus sake*.

La purification a été conduite en suivant les principales étapes de purification décrites par Montel *et al.* (1994). Toutes ces étapes ont été effectuées à 10°C avec un appareil de chromatographie liquide FPLC (Pharmacia).

Le mode opératoire est le suivant :

2 dépôts de 2 ml de l'extrait intra cellulaire concentré sur cellule Amicon (membrane YM 10 de seuil de coupure de 10 kD) à 10°C, ont été effectués sur colonne Séphacryl S 200 HR (gel filtration qui permet de séparer les protéines de taille comprise entre 10 kD et 600 kD) et élués avec du tampon tris 20 mM pH 7,6. Après élution les fractions protéiques (2 ml par fraction) présentant une activité dipeptidasique ont été mélangées. Le mélange protéique a été ensuite déposé sur une colonne DEAE Sépharose CL6B (échangeuses d'anions) équilibrée avec du tampon tris/HCl 20 mM + NaCl 120 mM à pH 7,6. Les protéines retenues sur cette colonne ont été éluées par un gradient de sels de 120 à 240 mM de NaCl et récupérées dans des fractions de 2 ml. L'activité dipeptidasique des différentes fractions éluées a été recherchée car la dipeptidase du fait de sa charge est retenue sur la colonne. Les fractions présentant une activité dipeptidasique ont été mélangées puis injectées sur une colonne Mono Q (échangeuses de cations) équilibrée avec du tris/HCl 20 mM + NaCl 240 mM à pH 7,6. En raison de la valeur de son pHi (Montel *et al.*, 1994), la dipeptidase purifiée se trouve dans la fraction protéique qui ne s'accroche pas sur la colonne.

Après purification la dipeptidase a été conservée à -80°C.

5 -2-9 Purification de la VXase de *Corynebacterium glutamicum*.

La purification a été conduite à partir d'extraits intra cellulaires de *Corynebacterium glutamicum* obtenus par culture de 2 L en milieu minéral nutritif (10 g.L⁻¹ de fructose, 5 g.L⁻¹ d'extrait de levure, 15 g.L⁻¹ tampon phosphate à 15 g.L⁻¹) puis par lyse des cellules par voie enzymatique.

Les extraits (25 à 30 ml environ) ont été injectés sur colonne Q Sépharose Fast Flow (colonne échangeuse d'anions) équilibrée en tris/HCl 20 mM pH 8. Le volume d'extrait injecté a été déterminé en fonction de la capacité maximale de la colonne QSFF 26/10 qui est selon les

données constructeur est comprise entre 300 et 600 mg ; une quantité de protéines supérieures ou égales à la capacité de la colonne a pour effet de saturer les sites de la colonne et de ne plus permettre l'accrochage des protéines pertinentes. L'élution a été effectuée par un gradient linéaire de NaCl (0 à 1M) en tampon tris/HCl pH 8 (10 volumes de colonne). Les fractions non retenue (30 ml) et éluées (volume 5 ml) ont été testées une à une par la méthode d'Ellman comme décrite au chapitre 4 paragraphe 4-2-7. Le tampon d'élution et des fractions autoclavées (20 min 120°C) ont été employés comme témoins abiotiques. Les fractions d'intérêt, c'est-à-dire celles présentant une activité catalytique de l'hydrolyse du VX avant autoclavage mais n'en présentant plus après, ont été mélangées. Le mélange a été concentré par ultrafiltration sur membrane de 10 kD puis injecté sur une colonne de gel filtration S300 équilibrée en tris/HCl 20 mM + NaCl 0,15 M à pH 8. Des fractions de 5 ml ont été obtenues. L'activité de chaque fraction (forme native et dénaturée par autoclavage) a été testée par la méthode d'Ellman. Les fractions présentant une activité d'hydrolyse du VX ont été associées. Après purification, le mélange de fractions qui correspond à la VXase, est aliquoté et conservé au froid à -80°C.

5-3 Résultats expérimentaux.

5-3-1 Purification de la dipeptidase

La purification a été effectuée à partir d'un extrait intra cellulaire provenant de 4 cultures de *Lactobacillus sake* en batch de 2L (8L de culture au total). L'extrait après lyse a un volume de 35 ml et contient 1.7 g.L⁻¹ de protéines. Avant injection sur la première colonne, l'extrait est concentré par ultrafiltration sur membrane de 10kD pour atteindre un volume de 4 ml puis il est déposé en 2 fois (2 ml par dépôt) sur la colonne Séphacryl S 200HR. Après élution, 35 fractions de 2 ml sont obtenues pour chaque injection. Les fractions présentant une activité dipeptidasique sont les fractions 16 à 25 pour la première injection et 22 à 30 pour la seconde. Ces différentes fractions sont mélangées puis injectées sur la colonne DEAE Sépharose. L'élution permet d'obtenir des fractions de 2 ml dont 10 présentent une activité dipeptidasique. Ces fractions sont associées puis injectée sur la colonne Mono Q. L'activité dipeptidasique est retrouvée dans la fraction non retenue.

Le tableau 21 résume les résultats obtenus (protéines totales, activité spécifique, taux de purification...) au cours des différentes étapes de la purification de la dipeptidase de *Lactobacillus sake*.

Tableau 21 : Bilan des étapes de la purification de la dipeptidase de *Lactobacillus sake*.

Étapes de purification	Volume (ml)	Concentration protéique mg.ml ⁻¹	Protéines totales (mg)	Activité dipeptidasique UDO.min ⁻¹	Activité spécifique UDO.min ⁻¹ mg ⁻¹	Taux de purification
Extrait intracellulaire	135	1,7	230	0,138	8	/
Séphacryl S 200HR	29,5	0,8	23,6	0,1	125	15
DEAE Sépharose	20	0,15	3	0,24	1600	200
Mono Q	50	0,018	0,9	0,24	2660	330

Après purification, la solution enzymatique (50 ml) de dipeptidase à 0,018 mg.ml⁻¹ purifiée a été concentrée par ultrafiltration sur une membrane de seuil de coupure de 30 kD. Le volume de la solution enzymatique a été ramenée à 4 ml et sa concentration protéique à 0,1 mg.ml⁻¹. Le rendement protéique de l'ultrafiltration est de 44%.

5-3-2 Détermination de la capacité de la dipeptidase à de *Lactobacillus sake* hydrolyser le VX

5-3-2-1 Protocole

La capacité de la dipeptidase (50 µg.ml⁻¹) à dégrader le VX (Ci = 0,05 g.L⁻¹) a été déterminée en tampon PBS à pH 7,2 et 37°C. La concentration d'enzyme utilisée correspond à celle employée par Hoskin *et al.* (1995) pour tester la capacité de l'OPH à hydrolyser le VX. Le témoin abiotique utilisé pour l'expérimentation est constitué de tampon PBS. Le devenir du VX a été suivi par la méthode d'Ellman.

5-3-2-2 Résultats

Les vitesses de dégradation du VX mesurées par la méthode d'Ellman (Figure 25) sont égales à $3,1 \mu\text{M}\cdot\text{h}^{-1}$ en conditions abiotiques et de $2,9 \mu\text{M}\cdot\text{h}^{-1}$ en présence de la dipeptidase. La présence de la protéine n'entraîne pas d'augmentation de la vitesse de dégradation du VX. Il n'y a pas de rupture de la liaison P-S du VX induite par l'enzyme.

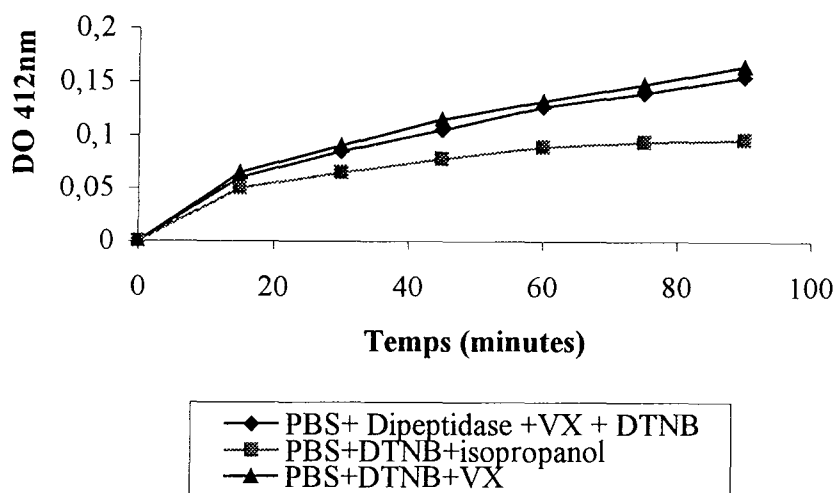


Figure 25 : Variations de DO à 412nm en fonction du temps en tampon PBS avec et sans VX, avec et sans dipeptidase, pH 7,2, 37°C (détermination par la méthode d'Ellman).

5-3-3 Purification de la VXase

Notre objectif est, à partir d'un extrait intra cellulaire de *Corynebacterium glutamicum*, de purifier partiellement une protéine appelée arbitrairement VXase, capable de dégrader le VX, de déterminer les constantes catalytiques de la réaction et d'évaluer son poids moléculaire.

5-3-3-1 Protocole de la purification

La purification a été conduite avec des extraits intra cellulaires obtenus à partir de 2L de culture de *Corynebacterium glutamicum* en milieu minéral nutritif (extrait de levure $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, fructose $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, tampon phosphate $15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). Les cultures de *Corynebacterium glutamicum* ont été stoppées en fin de phase de croissance (DO = 4,5 environ). Les bactéries ont été séparées du milieu de culture par micro-filtration, puis lysées par le lysozyme (450 mg d'enzyme pour 30 ml de cellules présentant une DO à 600 nm de 150). Les caractéristiques (volume, concentration protéique) d'un extrait sont présentés Tableau 22.

5-3-3-2 Résultats

Après passage de l'extrait sur la colonne échangeuse d'anions QSFF, différentes fractions protéiques de 5 ml sont obtenues (Figure 26), leur capacité à hydrolyser le VX ($C_i = 0,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) est recherchée par la méthode d'Ellman. La fraction non retenue (35 ml) ne présente pas d'activité d'hydrolyse du VX. En revanche, 2 séries de fractions retenues présentent une activité catalytique de l'hydrolyse du VX et du tétriso. La première série composée des fractions 5 à 9 a une activité spécifique de $25 \mu\text{M} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de protéines (pH 8, 28°C), la deuxième série constituée des fractions 17 à 20 a une activité spécifique de $17 \mu\text{M} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de protéines (pH 8, 28°C).

Après dénaturation thermique ($120^\circ\text{C} - 20 \text{ min}$ à l'autoclave), la série des fractions 5 à 9 (mélange 1) conserve la même activité catalytique de l'hydrolyse du VX alors que la série des fractions 17 à 20 (mélange 2) perd sa capacité à hydrolyser le VX. La dégradation du VX due au mélange 2 est d'origine biologique alors que la dégradation occasionnée par le mélange 1 est d'origine abiotique. Les caractéristiques du mélange 2 et le taux de purification sont repris dans le Tableau 22.

Le mélange 2 a été concentré par ultrafiltration sur membrane de seuil de coupure de 10 kD, avant d'être injecté sur la colonne gel filtration S300 HR. Il apparaît que la concentration des fractions après la colonne QSFF est pénalisante car le rendement de purification reste du même ordre (Tableau 22) alors que la quantité de protéines chute de 30% environ (Tableau 22). La chromatographie d'exclusion (Figure 27) permet de séparer environ 40 fractions protéiques. L'activité d'hydrolyse des différentes fractions est mesurée en prenant comme témoin abiotique le tampon d'élution (tris/HCl 20 mM, 0.15 M de NaCl, pH8). Parmi ces fractions, 3 (33 à 35) éluées au temps de rétention 170 minutes entraînent une vitesse d'hydrolyse du VX supérieure à celle du tampon d'élution. La capacité de ces 3 fractions à hydrolyser le VX disparaît après autoclavage (20 min, 120°C). L'activité hydrolytique des 3 fractions est bien d'origine biologique. Ces 3 fractions sont mélangées pour donner le système enzymatique qui correspond à la VXase, la concentration protéique du système est de $33 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ (Tableau 22).

Tableau 22 : Bilan de la purification de la VXase (Vitesses d'hydrolyse du VX et activités spécifiques au cours de la purification)

Etapes de purification	Volume (ml)	Concentration protéique mg.ml ⁻¹	Protéines totales (mg)	Vitesse d'hydrolyse ⁽¹⁾ (μM.h ⁻¹)	Activité spécifique (μM.h ⁻¹ .mg ⁻¹)	Taux de purification
Extrait intra cellulaire	30	5	150	9,4	2	/
QSFF	24	0,4	9,6	6,4	17	8
Ultrafiltration 10 kD	10	1,08	8,8	7	15	7,5
S300 HR	12	0,033	0,4	3,3	110	55

(1) la vitesse d'hydrolyse biologique du VX est obtenue après déduction des vitesses d'hydrolyse physico-chimique du VX et de réduction spontanée du DTNB (non due à l'hydrolyse de la liaison P-S).

5-3-4 Etude des constantes enzymatiques de la VXase

L'objectif est de déterminer expérimentalement les constantes V_m (vitesse maximale) et k_m (constante de Michaelis) de la VXase en utilisant la représentation graphique de Lineweaver-Burk : $f(1/\text{concentration de VX}) = 1/\text{vitesse de dégradation biologique}$.

5-3-4-1 Protocole

Les vitesses d'hydrolyse du VX (C_i = 100, 250, 400, 500, 600 et 750 mg.L⁻¹) ont été déterminées par la méthode d'Ellman (1 essai par concentration) après purification de la VXase (0.03mg.ml⁻¹ concentration finale) en tampon tris/HCl 20mM, pH 8 à 28°C. Le témoin abiotique est constitué du même tampon sans protéines. Après essai, le graphe $f(1/S) = 1/V$ a permis de déterminer graphiquement une valeur de k_m et V_m.

Chromatogram Questions

No 1: Sample volume and type:

25 ml EICg lysé le 06/07/99

No 2: Column:

QSFF 16/13

No 3: Eluent A:

Tris 20 mM pH 8

No 4: Eluent B:

A + 1 M NaCl

No 5: Flow :

5 ml/min.

No 6: Gradient :

0 à 100 % de B en 10 CV

No 7: Vol. fractions :

5 ml

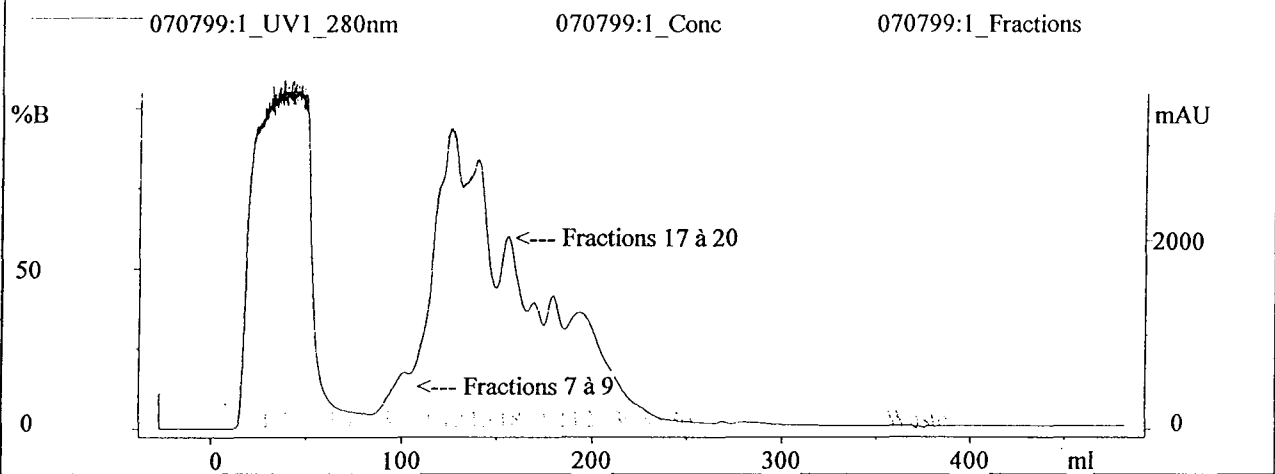


Figure 26 : Chromatogramme de la chromatographie liquide de l'extrait intracellulaire de *Corynebacterium glutamicum* sur QSFF.

Chromatogram Questions

No 1: Sample volume and type:

6 ml de fraction 1 obtenue après QSFF

No 2: Column:

Séphacryl S300 HR

No 3: Eluent:

Tris 20 mM + 0.15 M NaCl pH 8

No 4: Vol. fraction :

5 ml

No 5: Flow :

1 ml/min.

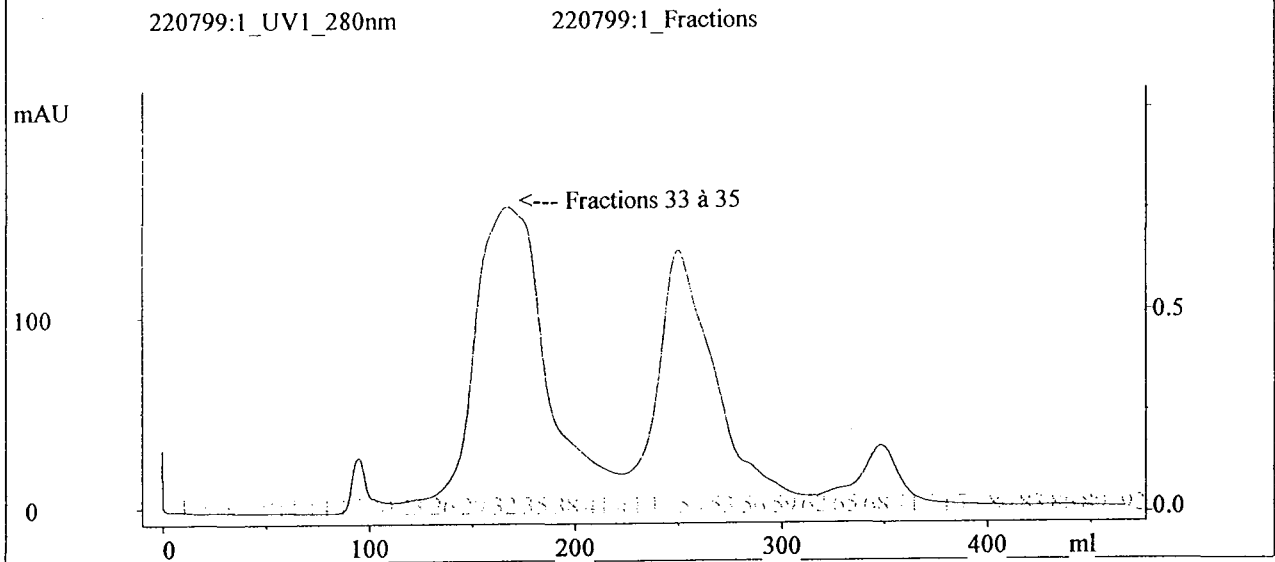


Figure 27 : Chromatogramme de la chromatographie liquide sur colonne S300 du mélange de fractions obtenues après colonne QSFF.

5-5-4-2 Résultats

Le graphe $f(1/S) = 1/V$ (Figure 27) a été tracé à partir d'une moyenne de 2 valeurs par points. Les constantes enzymatiques de la VXase, déterminées graphiquement (Figure 27) sont : $k_m = 1000 \text{ mg.L}^{-1}$ (3,74 mM) et $V_m = 10 \text{ } \mu\text{M.h}^{-1}$.

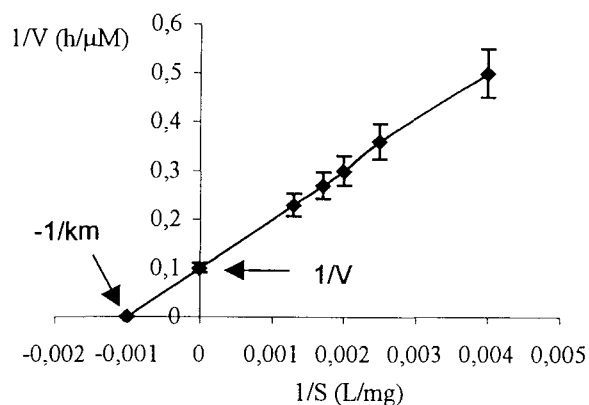


Figure 27 : Détermination des constantes V_m et k_m de l'hydrolyse du VX par la VXase selon la méthode de Lineweaver et Burk.

5-3-5 Détermination de la pureté, du poids moléculaire de la VXase.

5-3-5-1 Protocole.

La pureté de la VXase a été déterminée par électrophorèse en conditions dénaturantes. Pour déterminer parmi les protéines mises en évidence par l'électrophorèse celle qui hydrolyse le VX, le mélange protéique constituant la VXase (cf. paragraphe 5-3-3-2) a été fractionné en quatre fractions de poids moléculaire différent par ultrafiltration sur membranes de seuil de coupure de 10, 30 et 50 kD, L'activité catalytique de chaque partie a été mesurée par la méthode d'Ellman.

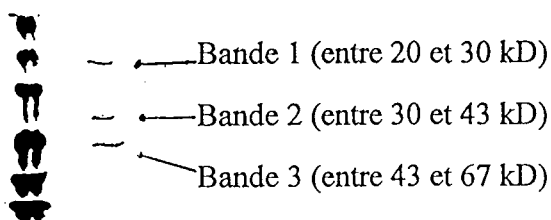
5-3-5-2 Résultats

L'électrophorèse (Figure 28) indique la présence de 3 bandes protéiques : une de poids moléculaire compris entre 20 et 30 kD, une comprise entre 30 et 43 kD, une entre 43 et 67 kD.

Les ultrafiltrations permettent d'obtenir 4 fractions : une de taille inférieure à 10 kD, une comprises entre 10 et 30 kD, une entre 30 et 50 kD et une supérieure à 50 kD. Seule la fraction de taille comprise entre 30 et 50 kD entraîne une hydrolyse biologique du VX (Tableau 23). La protéine de poids moléculaire compris entre 30 et 43 kD semble correspondre à l'enzyme capable d'hydrolyser le VX.

Tableau 23: Vitesse ($\mu\text{M}\cdot\text{h}^{-1}$) de dégradation du VX ($C_i = 0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) par les fractions d'ultrafiltration de la VXase.

	Fraction de taille inférieure à 10 kD	Fraction de taille comprise entre 10 et 30 kD	Fraction de taille comprise entre 30 et 50 kD	Fraction de taille supérieure à 50 kD
Vitesse de dégradation	1	1,5	4	1,9
Vitesse de dégradation après dénaturation	0,9	1,3	1,3	1,2



Marqueurs VXase

Figure n° 28 : Electrophorèse de la VXase (Taille des marqueurs de 94; 67; 43; 30; 20.1 ; 14.4 kD).

5-3-6 Recherche de la capacité de la VXase à hydrolyser le paraoxon

L'objectif, dans un but de comparaison avec l'OPH, est de déterminer si la VXase est capable d'hydrolyser le paraoxon (COP à liaison P-O) qui est le substrat organophosphoré de choix de l'OPH.

5-3-6-1 Protocole

La capacité de la VXase à hydrolyser le paraoxon a été déterminée par spectrophotométrie, en tampon tris/HCl 20mM, pH8 à 28°C. Le mode opératoire de la méthode d'Ellman a été suivi en remplaçant le VX par du paraoxon et en mesurant à 400nm la variation d'absorbance en absence de DTNB. L'hydrolyse du paraoxon entraîne à 400 nm une coloration jaune due à l'accumulation de *P* nitrophénol (Dumas *et al.* 1988) Le témoin abiotique est constitué de tampon tris/HCl 20mM, pH8.

5-3-6-2 Résultats

En tampon tris/HCl 20mM, pH8 à 28°C, aucune différence de variation d'absorbance à 400 nm en fonction du temps n'est observée entre l'essai biologique et l'essai abiotique. Il n'y a pas formation d'origine biologique de para nitrophénol. La VXase n'hydrolyse pas le paraoxon.

5-4 DISCUSSION

Nous avons partiellement purifié une enzyme capable d'hydrolyser la liaison P-S du VX et entamer sa caractérisation. La littérature reporte différents exemples de purification et caractérisation d'enzymes capables de dégrader les composés organophosphorés (Defranck et Tu-Chen, 1991) mais parmi ces enzymes seule l'OPH a été décrite comme capable d'hydrolyser la liaison P-S (Hoskin et Walker, 1997). L'OPH se présente comme l'enzyme de référence pour évaluer l'intérêt de la VXase. Les résultats que nous avons obtenu lors de la purification et de la caractérisation de la VXase sont dans cette discussion comparés aux données disponibles sur l'OPH.

La comparaison des données de purification de la VXase et de l'OPH (Tableau 24) indique que l'OPH est pure (1 seule bande protéique) alors que la VXase ne l'est pas

totallement (présence de 3 bandes). La purification de la VXase n'est pas optimale, ce que confirme la comparaison des taux de purification des deux enzymes (1500 pour l'OPH , 55 pour la VXase). La différence constatée sur les taux de purification de la VXase et l'OPH peut s'expliquer à trois niveaux :

- nombre d'étapes de chromatographie liquide utilisées lors des procédés de purification des deux enzymes,
- étape de concentration entre la colonne QSFF et S300 qui entraîne une chute de l'activité de la VXase,
- ajout de cations bivalents dans les tampons d'élution pour maintenir l'activité catabolique de l'OPH.

Tableau 24 : Comparaison des taux de purification de la VXase de *Corynebacterium glutamicum* et de l'OPH de *Pseudomonas diminuta*.

	VXase	OPH ⁽¹⁾
Taux de purification	55	1500
Nombre de colonnes utilisées	2	5
Quantité de protéines initiales (mg)	150	5400
Quantité de protéines finales (mg)	0,4	2,7
Nombre de bandes sur l'électrophorèse de contrôle	3	1
% de protéines restantes après purification	0,26	0,05

(1) Dumas *et al.* (1989)

Dumas *et al.* (1989) utilisent 5 étapes de chromatographie liquide alors que nous en avons employé 2 étapes. Chaque passage sur colonne permet d'éliminer des protéines, de réduire le

nombre de protéines présentes et d'augmenter la pureté. Dans notre procédé, nous n'avons pas pu inclure d'étapes de chromatographie liquide supplémentaires car la quantité de protéines de départ était très faible (56 fois moins que pour l'OPH – Tableau 24). Il serait nécessaire pour optimiser le taux de purification de la VXase de démarrer la purification avec une quantité de protéines au moins dix fois supérieure à celle que nous avons utilisé et d'introduire une étape de purification complémentaire de chromatographie liquide. Cette étape pourrait être :

- le passage sur une colonne échangeuses d'anions de plus forte résolution que la QSFF,
- un deuxième passage sur la QSFF avec un gradient ou un pH d'élution différent ,
- un passage sur une colonne de phase inverse,
- un passage sur colonne d'affinité.

La dernière solution serait la plus efficace mais nécessiterait un analogue du VX qui soit capable de se lier de façon réversible avec la VXase.

Lors de l'étape de concentration de la VXase entre les passages sur colonnes QSFF et S300, une stagnation de l'activité spécifique de la VXase et du taux de purification sont observés, cette étape d'ultrafiltration est pénalisante et peut être due à une déminéralisation de l'enzyme. Une diminution de l'activité catalytique d'une enzyme en cours de purification est toujours possible. Pour éviter cette diminution, Dumas *et al.* (1989), lors de la purification de l'OPH, éluent l'enzyme avec un tampon contenant 0,1mM de chlorure de zinc pour prévenir une déminéralisation de l'enzyme. L'OPH est une métalloprotéine et la présence de zinc dans le tampon d'élution permet de conserver une activité enzymatique optimale. Montel *et al.* (1995) ajoutent du cobalt après purification pour réactiver la dipeptidase de *Lactobacillus sake*. Dans notre procédé de purification, nous n'avons pas ajouté de métaux bivalents dans nos tampons d'élution, il est possible que la VXase ait subi une chute d'activité catalytique suite à la déminéralisation qui se produit lors des passages sur colonnes et de l'étape de concentration entre les colonnes QSFF et S300. La possibilité d'utiliser des tampons d'élution contenant des ions (bivalents ou autres) sera à discuter lorsque les caractéristiques de la VXase seront totalement connues.

Les résultats obtenus lors de la caractérisation (taille, k_m , activité spécifique ...) de la VXase sont résumés Tableau 25. Ce tableau fait aussi état des données bibliographiques disponibles dans la littérature pour l'OPH.

La comparaison des constantes cinétiques des deux enzymes montre que la VXase a une activité catalytique 10 fois plus forte que l'OPH, ce qui veut dire que la VXase à quantité égale est capable de dégrader 10 fois plus de VX que l'OPH pendant le même laps de temps. Ce résultat est particulièrement prometteur car l'activité catalytique de l'OPH a été mesurée par Kolakowski *et al.* (1997) dans des conditions opératoires optimales pour l'enzyme alors que nos mesures ont été effectuées avec un milieu réactionnel qui n'est pas forcément optimal pour la VXase. L'activité catalytique de la VXase peut encore être augmentée alors qu'il paraît beaucoup plus difficile d'augmenter celle de l'OPH car l'enzyme est totalement caractérisée, à moins d'augmenter son activité par génie génétique (Disioudi *et al.*, 1999). A contrario l'OPH paraît avoir une affinité (k_m) plus forte pour le VX que la VXase. La comparaison de la constante d'affinité (k_m) reste cependant très délicate car elle repose sur des expérimentations effectuées avec la même méthode d'essai (méthode d'Ellman) mais avec des paramètres expérimentaux différents (pH, force ionique, température, concentration enzymatique, pureté ...). Or le k_m (affinité) n'est pas une constante absolue, il varie en fonction du pH, de la température, des effecteurs, des tampons (Bergmeyer *et al.*, 1979). De plus la valeur du k_m déterminée expérimentalement pour la VXase, est seulement indicative car les expérimentations ont été effectuées avec seulement 5 concentrations de substrats qui de plus sont inférieures au k_m . Malheureusement, il n'a pas été possible de mesurer des activités enzymatiques de la VXase avec des valeurs de substrat (VX) supérieures au k_m car le VX n'est pas soluble dans des tampons tels que le tris au-delà de 1 g.L^{-1} (3,74 mM), et d'autre part, les purifications effectuées ne nous ont pas permis d'obtenir suffisamment de matériel biologique pour effectuer plus de 10 mesures (cinq concentrations et 2 mesures par concentration). Le k_{cat} de la VXase (nombre de rotation), en prenant comme poids moléculaire 40 kD peut être estimé à $1,22 \text{ s}^{-1}$. Comparé à l'OPH dont le k_{cat} est pour le VX égal à $0,3 \text{ s}^{-1}$ (Kolakowski *et al.*, 1997), le nombre de rotation est plus favorable pour la VXase que pour l'OPH. Cependant le nombre de rotation de la VXase ou de l'OPH vis à vis

du VX reste très faible comparé aux nombres de rotation (Lai *et al.*, 1995) de l'OPH vis à vis de l'hydrolyse de la liaison P-O (kcat pour le paraoxon = 3170 s⁻¹; kcat pour le parathion = 630 s⁻¹), il reste beaucoup de travail à effectuer pour disposer d'une enzyme capable d'hydrolyser la liaison P-S avec une efficacité comparable à l'hydrolyse de la liaison P-O.

La suite de la comparaison des deux enzymes indique que la VXase est une enzyme probablement de paroi qui n'hydrolyse pas le paraoxon (Tableau 25), l'OPH est membranaire (Defranck, 1991) et hydrolyse le paraoxon (Kolakowski *et al.*, 1997). Il apparaît que la VXase et l'OPH sont des protéines différentes, la VXase n'est pas une OPH mais une nouvelle enzyme capable d'hydrolyser la liaison P-S.

Tableau 25 : Caractéristiques de l'OPH de *Pseudomonas diminuta* (Kolakowski *et al.*, 1997) et de la VXase de *Corynebacterium glutamicum*.

	OPH	VXase ⁽¹⁾
Poids moléculaire	2 sous unités de 35 kD ⁽²⁾	entre 30 et 43 kD
Localisation	membranaire	paroi
km	0,44 mM ⁽²⁾⁽³⁾	3,74 mM
Activité	10 μM.h ⁻¹ .mg ⁻¹ ⁽²⁾⁽³⁾	110 μM.h ⁻¹ .mg ⁻¹
Capacité à hydrolyser le paraoxon	oui ⁽²⁾	non

(1) tampon tris/HCl 20mM pH 8, 28°C, (2) Kolakowski *et al.* 1997, (3) tampon BTP 50mM, pH 8,5, 25°C

5.5 Conclusions

L'objectif de notre travail était de purifier partiellement une enzyme capable d'hydrolyser le VX. L'objectif a été atteint, un procédé de purification par chromatographie liquide (passage sur colonnes échangeuse d'anions et gel filtration) a permis d'isoler une enzyme, appelée arbitrairement la VXase, à partir d'un extrait intra cellulaire de *Corynebacterium glutamicum*. Cette enzyme est capable d'hydrolyser la liaison P-S du VX, mais n'hydrolyse pas le paraoxon. Sa caractérisation a mis en évidence les constantes cinétiques de l'hydrolyse du VX (affinité, activité spécifique) et permis une évaluation du poids moléculaire de l'enzyme compris entre 30 et 43 kD. La comparaison des caractéristiques de la VXase et de l'OPH, enzymes capables d'hydrolyser le VX et le tétriso, indique que les deux enzymes présentent peu d'analogies entre elles. La VXase est une nouvelle enzyme capable d'hydrolyser la liaison P-S, cependant la purification de la VXase n'est pas optimale et demande des améliorations en particulier il serait nécessaire de débiter la purification avec une quantité de protéines supérieures et d'inclure une étape supplémentaire de purification par chromatographie liquide. Il faudra ensuite effectuer une caractérisations plus poussée de la VXase pour déterminer l'influence : des cations bivalents, des tampons réactionnels, du pH et de la température sur son activité catalytique.

6 – CONCLUSIONS GENERALES & PERSPECTIVES.

La détoxification des composés organophosphorés à liaison P-S impose la rupture de cette liaison. Cette rupture peut être obtenue facilement par voie chimique par oxydation à pH alcalin mais il serait aussi intéressant de pouvoir la réaliser par voie biologique. Or les composés organophosphorés à liaison P-S sont dans leur ensemble récalcitrants à la dégradation biologique, seule une enzyme, l'OPH, ayant été décrite comme capable de cliver la liaison P-S, tandis que de nombreuses enzymes aptes à couper les liaisons P-O, P-C, P-F, P-CN sont citées dans la littérature. Le travail développé ici avait pour ambition d'isoler une enzyme catalysant l'hydrolyse de la liaison P-S du VX un composé organophosphoré développé à usage militaire. L'étude, toutefois, ne s'est pas seulement focalisée sur ce composé, tout au long des expérimentations, nous avons tenu à examiner si les résultats obtenus sur le VX s'appliquaient au tétriso et au déméton-S-méthyl, deux organophosphorés à liaison P-S.

Pour atteindre l'objectif fixé, la démarche s'est articulée en quatre axes.

Le premier axe a consisté à étudier le comportement abiotique du VX pour identifier les paramètres qui favorisent l'instabilité chimique constatée par de nombreux auteurs (Bezeau, 1996). Le tampon phosphate a été trouvé comme un facteur favorisant l'instabilité du VX mais pas celle du déméton-S-méthyl.

Le deuxième axe a résidé dans la comparaison de la capacité de différents micro-organismes en culture à dégrader le VX. Une bactérie – *Corynebacterium glutamicum* – s'est imposée comme un micro-organisme de choix pour dégrader biologiquement les trois composés à liaison P-S. Cette souche a permis de rechercher l'impact des sucres, de l'extrait de levure et du tampon phosphate sur la biodégradation du VX. Il a été observé que les vitesses de dégradation biologique du VX augmentaient avec la concentration en tampon phosphate et/ou d'extrait de levure. Le tampon phosphate pourrait favoriser le transport du VX vers le compartiment intra cellulaire et l'extrait de levure serait un cofacteur de la réaction enzymatique. La présence d'un sucre : glucose ou fructose est apparue nécessaire pour que le VX soit dégradé par *Corynebacterium glutamicum* mais la vitesse de dégradation n'a pu être reliée à la concentration en sucre. Les mêmes constatations ont été faites avec le tétriso mais il

est apparu que les vitesses de dégradation biologique du déméton-S-méthyl n'augmentaient pas avec les concentrations en tampon phosphate et/ou d'extrait de levure. Les analyses chimiques effectuées par CPG et ^{31}RMN ont indiqué que l'action de *Corynebacterium glutamicum* sur le VX et le déméton-S-méthyl se différenciait car la bactérie clive la liaison P-S du VX mais agit sur la liaison S-C du déméton-S-méthyl. La dégradation du VX et du déméton-S-méthyl par *Corynebacterium glutamicum* n'est pas régie par les mêmes mécanismes.

Le troisième axe, intermédiaire, avait pour but de localiser l'activité enzymatique de *Corynebacterium glutamicum* pour préparer la purification d'une enzyme. L'activité enzymatique a été observée dans le compartiment intra cellulaire de la bactérie. Les extraits intra cellulaires obtenus par différentes méthodes de lyse (pression, voie enzymatique) ont montré leur capacité à hydrolyser (clivage de la liaison P-S) le VX et le tétriso.

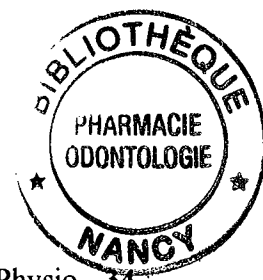
Le quatrième et dernier axe a consisté à amorcer la purification d'un système enzymatique –appelé VXase- capable d'hydrolyser le VX, à partir d'extrait intra cellulaire de *Corynebacterium glutamicum* et à commencer la caractérisation de ce système.

En conclusions un mélange de 3 protéines capable de rompre la liaison P-S du VX et du tétriso a été purifié par chromatographie liquide. Son activité spécifique a été déterminée, elle est de l'ordre de $110 \mu\text{M}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$, 10 fois supérieure à celle de l'OPH. Son poids moléculaire pouvant être estimé à 40 kD, son K_{cat} peut être approximé à $1,22 \text{ s}^{-1}$. Le K_{cat} de l'OPH étant de $0,3 \text{ s}^{-1}$ (Kolakowski et *al.*, 1997), la VXase apparaît plus efficace que l'OPH à hydrolyser la liaison P-S du VX.

L'objectif du travail a été atteint, mais pour autant tout n'est pas parfait, le chemin à parcourir est encore long. La préparation (production et purification) de l'enzyme doit être optimisée, ce travail est en cours au CEB. Tout d'abord la quantité d'enzymes disponibles en amont de la purification doit être augmentée, l'utilisation d'une French Press pour lyser la bactérie semble prometteuse, des essais préliminaires indiquent que la quantité de protéines obtenue par lyse avec la French Press est de 15 à 20 fois supérieure à la quantité obtenue par lyse sous azote. La purification est en train d'être améliorée par l'utilisation d'une étape complémentaire de chromatographie liquide sur colonne échangeuse d'anions QSFF, effectuée

avec des conditions opératoires différentes de la première colonne échangeuse d'anions (gradient d'éluion et pH différents), les premiers essais sont encourageants. La caractérisation de l'enzyme VXase doit être poursuivie, l'effet du pH, de la température, des métaux ; les temps de demi-vie ; la compatibilité avec différents tampons ou solvants doivent être recherchées. Enfin pour achever ce travail, il sera utile d'un point de vue pratique d'évaluer si la VXase peut être employée pour un procédé de décontamination du VX, d'un point de vue scientifique il faudra rechercher cette protéine chez d'autres corynebactéries, la séquencer, remonter au gène codant et déterminer son rôle physiologique chez la bactérie.





REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adie P.A., 1956, The purification of sarinase from bovine plasma, *Can. J. Biochem. Physio.*, **34** : 1091-1094.
- Adie P.A., 1958, The intracellular localisation of liver and kidney sarinase, *Can. J. Biochem. Physio.* **36** : 21-24.
- Adrian E.D., Feldberg W., Kilby B.A. 1947. *Brit. J. Pharmacol.*, **2** :56
- Ahmad N., D.D. Walgenbach and G.R. Sutter, 1979, Comparative disappearance of fonofos, phorate and terbufos soil residues under similar south Dakota field conditions, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **23** : 423-429.
- Ahmed M.K. and J.E. Casida, 1958, Metabolism of some organophosphorus insecticides by microorganisms, *J. Econ. Entomo.*, **51** : 59-63.
- Anderson J.P.E., 1989, Biotechnology and Biodegradation, Gulf Publishing Company Book Division : 129-145.
- Alexander M., 1973, Non biodegradable and other recalcitrant molecules, *Biotechn. Bioeng.*, **15** : 611-647.
- Augustinson K.B., 1954, Enzymatic hydrolysis of organophosphorus compounds, *Biochem. Biophys. Acta.*, **13** : 303-304.
- Augustinson K.B., 1955, Enzymatic hydrolysis of organophosphorus compounds, effect of phosphoryl phosphatase on inactivation of cholinesterases by organophosphorus compounds in vitro, *Acta. Chem. Scand.*, **9** : 310-318.
- Benshop H.P., Konings C.A.G., Van Gederen J. and L.P.A. De Jong, 1983, Isolation, anticholinesterase properties and acute toxicity of the four stereoisomers of the nerve agent soman, *Phosphorus. Sulfur.*, **21** :345-349.
- Bergè J.P et N. Pasteur, 1996, Les insectes face aux insecticides, *Biofutur.*, **152** :13-18.
- Bergmeyer H.U., 1979, Principe de l'analyse enzymatique, Ed Technique et Document, 303 pages.
- Bezeau S., 1996, Recherche de biodégradeurs spécifiques du VX, un agent de guerre chimique, Thèse de Doctorat de l'Université Montpellier 1, 192 pages.
- Bonerdiale E., L. Debordes and L.Coppet, 1997, Application of capillary gas chromatography to the study of hydrolysis of the nerve agent VX in rat plasma, *J. Chroma. B.*, **688** : 255-264.
- Bourquin A.W., 1977, Degradation of malathion by saltmarsh microorganisms, *Appl. Environ. Microbiol.*, **33** : 356-362.

- Bowman B.T. and W.W. Sans, 1979, The aqueous solubility of twenty seven insecticides and related compounds, *J. Environ. Sci. Health.*, **14** : 625-634.
- Buitron-Mendez G., 1993, Biodégradation de composés xénobiotiques par un procédé discontinu de type SBR, Thèse de doctorat de l'INSA Toulouse, N°254, 208 pages.
- Broomfield C.A., 1992, A purified recombinant organophosphorus acid anhydrase protects mice against soman, *Pharmacol. Toxicol.* **70**: 65-66.
- Cassagne T., 1996, Décontamination chimique des composés organophosphorés toxiques par nucléophiles oxydants à effet alpha, Thèse de Doctorat de l'Université Montpellier 1, N° 96 Mon2079, 193 pages.
- Chapman R.A. and C.R Harris, 1980, Persistence of chloropyrifos in a mineral and organic soil, *J. Environ. Sci. Health.*, **15** : 39-46.
- Chapman R.A. and C.R Harris, 1980, Insecticidal activity and persistence of terbufos, terbufos sulfoxide and terbufos sulfone in soil., *J. Econ. Entomol.*, **73** : 536-543.
- Chapman R.A., C.M. Tu and C.R Harris, 1982, Biochemical and chemical transformation of phorate, phorate sulfoxide and phorate sulfone in natural and sterile mineral and organic soil., *J. Econ. Entomol.*, **75** :112-117.
- Cheah S.C, H. Hussey, I. Hancock and J. Baddiley, 1982, Control of synthesis of wall teichoic acid during balanced growth of *Bacillus subtilis* W23, *J. Gen. Microbiol.*, **128** : 593-599.
- Chen W. and A. Mulchandani, 1999, La détoxification des pesticides., *Biofutur.*, **187** : 41-43.
- Cheng T.C and J.J Defranck, 1995, Bacterial nerve agent degrading enzyme that is similar to a dipeptidase nucleotide sequence and activity, Communication to Scientific conference on chemical and biological defense research, Edgewood, USA.
- Cocaign M., C. Monnet and N.D. Lindley, 1993, Batch kinetics of *Corynebacterium glutamicum* during growth on various carbon substrates : use of substrates mixtures to localise metabolite bottlenecks, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **40**: 526-530.
- Colwell R.R., J.G. Leahy, J. Nelson and M.J. Voll. 1989. Genetic engineering applied to microbial degradation of organophosphates. Chemical Research Development and Engineering Center, DAAK 11-84-R-0027/AD-A208 247.
- Cook A.M., 1988, Combined carbon and phosphorus or sulfur substrates, In mixed and multiple feedstock, Ed. Hamer., 71-83.
- Cork D.J., S.A. Yahyia and F.C.G. Hoskin, 1984, The detoxification of tetriso by *Bacillus cereus*, *Biotechnol. Lett.*, **67** : 445-450.

- Crenshaw M.D., L. Hernon-Kenny, F. Moore, D. Cummings and M. Pence, 1994, Degradation of GB, VX and HD in groundwater, Scientific Conference on Chemical and Biological Defense, 15-18 november, Edgewood.
- Dalton H. and D.G. Stirling, 1982, Cometabolism, Phil. Trans. Roy. Soc. Lon., **B297**: 481-496.
- Defrank J.J., 1989, Enzymatic hydrolysis of toxic organofluorophosphate compounds, Biotechnology and biodegradation, Gulf Publishing Company : 183-201.
- Defrank J.J. and T.C. Cheng, 1991, Purification and properties of an organophosphorus acid anhydrase from a halophilic bacterial isolate, J. Bacteriol., **173**, 1938-1943.
- Defrank J.J. 1991. Organophosphorus cholinesterase inhibitors, detoxification by microbiological enzymes, In Application of Enzyme Biotechnology, Ed. Kelly J.W. and Balwin T.O, Plenum Press New York, 165-180.
- Defrank J.J., I.J. Fry, J.P. Earley and R.L. Irvine, 1997, Biodegradation of VX/Water hydrolysate, Rapport ERCECTR429, 13 pages.
- Defrank J.J. and V.K. Rastogi, 1998, Enrichment of microbial cultures for hydrolysis of EA219, Rapport ERDECCR255, 12 pages.
- Devaux G., 1999, Communication personnelle, Centre d'Etudes du Bouchet, Vert le petit, France.
- Di Sioudi B.D., C.E. Miller, K. Lai, J.K. Grimsley and J.R. Wild, 1999, Rational design of organophosphorus hydrolase for altered substrate specificities, Chem. Biol. Interact., **119** : 211-223.
- Dominguez H., C. Rollin, A. Guyonvarch, J.L. Guerquin-Kern, M. Cocaign-Bousquet and N.D. Lindley, 1993, Modified carbon flux during oxygen limited growth of *Corynebacterium glutamicum* and the consequence for amino acid overproduction, Biotechnol. Lett., **15** : 449-454.
- Dumas D.P., S.R. Caldwell, J.R. Wild J.R. and F.M. Rauchel, 1989, Purification and properties of the phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta*, J. Biol. Chem., **264** : 19659-19665.
- Dumas D.P., H.D. Durst, W.G. Landis, F.M. Rauchel and J.R. Wild, 1990, Inactivation of organophosphorus nerve agents by the phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta*, Arch. Biochem. and Biophys., **277** : 155-159.
- Dzwonkowska A. and H. Hubner, 1986, Induction of chromosomal aberrations in the syrian hamster by insecticides tested in vivo, Arch. Toxicol., **58** : 152-156.
- Ember L., 1997, Detoxifying nerve agent, Chem. Eng. News, **15** : 26-29.
- Epstein J., J.J. Callahan and V.E. Bauer, 1974. The kinetics and mechanism of hydrolysis of phosphonothiolates in dilute aqueous solution, Phosphorus, **4** : 157-163.
- Forrest M., K.A. Lord and N. Walker, 1981, The influence of soil treatments on the bacterial degradation of diazinon and other organophosphorus insecticides., Environ. Pollut., **24** : 93-104.

- Francis J.M and D.H. Craston, 1994, Immuno assay for parathion without its prior removal from solution in hexane, *Analyst.*, **119** : 1801-1805.
- Fu F. and M. Sun, 1989, Occurrence of VX oxydase, *Zhonggui Yaolixue Yu Dulixue Zazhi*, **3**, 264-270.
- Girbal L., J.L. Rols et N.D Lindley, 1998, Détermination des capacités de biotransformation du déméton-S-méthyl par *Corynebacterium glutamicum* et caractérisation des phénomènes impliqués, Rapport de recherche INSA, 27 pages.
- Girbal L., D. Hilaire, S. Leduc, L. Delery, J.L. Rols et N.D Lindley, 2000, Reductive cleavage of demetonSmethyl by *Corynebacterim glutamicum* in cometabolism on more readily metabolizable substrates, *Appl. Environ. Microbiol.*, **66** : 1202-1204.
- Gottschalk G. , 1985, Bacterial Metabolism, Second Edition Springer Verlag, 359 pages.
- Govan N. and A. Ward, 1998, Robust microemulsions for CBW decontamination, Communication to NATO Advanced Research Workshop, Decontamination the basis for chemical agent, Buccharest, Romania.
- Grognet J.M, T. Ardouin, T. Istin, M. Vahndais, A. Noel, J.P. Rima, G. Satge, C. Pradel, H. Sentenac-Roumanou and C. Lion, 1993, Production and characterization of antibodies directed against organophosphorus nerve agent VX, *Arch. Toxicol.* **67**, 66-71.
- Guyon A.G., 1976, Traité de physiologie, Doin Editeur Paris, 698-704.
- Haavik H.L., 1974, Studies on the formation of bacitracin by *Bacillus licheniformis* : effect of inorganic phosphate, *J. Gen. Microbiol.*, **84** : 226-230.
- Harris E.L ;V. and S. ANGAL, Protein purification methods, IRLPress,305 pages.
- Hilaire D., 1995, Comportement d'un composé organophosphoré en présence de microorganismes (cas du VX), Rapport de DEA Universités de Nancy, Pau et Poitier, 30 pages.
- Hilaire D., V. Morineaux, H. Garrigue et J.C. Block, 1998, Biological decontamination of nerve agent VX, Communication to CBW Protection Symposium, Stockholm, Sweden.
- Hilaire D., V. Morineaux, H. Garrigue et J.C. Block 1998, Biological decontamination of VX, Communication to NATO Advanced Research Workshop, Decontamination the basis for chemical agent, Buccharest, Romania.
- Holwerda E., 1975, Développement et isolement de microorganismes grâce à une combinaison sélective d'éthyl S2 diisopropylaminoethyl methylphosphonethionate (VX), *Chemisch Laboratorium TNO*, 27 pages.
- Horvath R.S. and M. Alexander, 1970, Cometabolism, a technic for the accumulation of biochemical products, *Can. J. Microbiol.*, **16** : 1131-1132.

- Horvath R.S., 1972, Microbial cometabolism and degradation of organic compounds in nature, *Bacteriological Reviews*, **36**: 146-155.
- Hoskin F.C.G., 1969, Possible significance DFPase in squid nerve, *Biol. Bull.*, **137** : 389-390.
- Hoskin F.C.G., 1971, Diisopropylphosphorofluoridate and tabun. Enzymatic hydrolysis and nerve function, *Science.*, **172** : 1243-1245.
- Hoskin F.C.G., 1972, Purification of a DFPhydrolysing enzyme from squid head ganglion, *Arch. Bio. Chem. Biophys.* **150** : 548-555.
- Hoskin F.C.G., 1976, Distribution of diisopropylphosphorofluoridate hydrolysing enzyme between sheath and axoplasme of squid giant axome, *J. Neurochem.*, **26** : 1043-1045.
- Hoskin F.C.G., M.A. Kirkish and K.E Steinmann, 1984, Two enzymes for the detoxification of organophosphorus compounds. Sources, similitaries and significance, *Tox. Appl. Pharmacol.*, **41** : 165-172.
- Hoskin F.C.G., J.E Walker, W.D. Dettbarn and J.R. Wild, 1995, Hydrolysis of tetriso by an enzyme derived from *Pseudomonas diminuta* as a model for the detoxification of VX, *Biochem. Pharmacol.*, **49** : 711,715.
- Hoskin F.C.G. and J.E Walker, 1997, Malathion as a model for the enzymatic hydrolysis of the neurotoxic agent, VX. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **59** : 9-13.
- Hoskin F.C.G., J.F. Walker and R. Stote, 1999, Degradation of nerve gases by CLECS and cells : Kinetics of heterogenous systems, *J. Chem. Bio. Interact.*, **119** : 439-444.
- Hovanec J.W., L.L.Szafraniec, J.M. Albizo, W.T. Beaudry, V.D. Henderson, Y. Yang, B.K. Maciver and L. Procel, 1993, Evaluation of standard and alternative methods for the decontamination of VX, HD in chemical agent disposal facilities. ERDEC-TR-054 ;PRMIPR M0207102.
- Jacquot S., 1995, Etude et optimisation de la biotransformation du démétonSméthyl par *Corynebacterium glutamicum*, Rapport de DEA, INSA Toulouse, 72 pages.
- Jamet P. et M.A. Piedallu, 1978, Cinétique de la dégradation du terbufos, *International Biodeterioration Bulletin*, **27** : 111-136.
- Jorand F., L. Murat et J.C. Block, 1997, Stabilité du démétonSméthyl en culture bactérienne, Rapport final , Contrat de recherche UHP, Nancy/DGA, Nancy, 43 pages.
- Jorand F. et J.C. Block, 1998, Biodégradation des neurotoxiques organophosphorés, Rapport intermédiaire, Contrat de recherche UHP, Nancy/DGA, Nancy, 17 pages.
- Jorand F., Guilloteau H. et J.C. Block, 1998, Biodégradation des organophosphorés neurotoxiques à liaison P-S, Rapport intermédiaire n°2, Contrat de recherche UHP, Nancy/DGA, Nancy, 15 pages.

- Kenneth D.R. and J.R. Coasts, 1988, Comparative degradation of organophosphorus insecticides in soil : specificity of enhanced microbial degradation, *J. Agric. Food. Chem.*, **36** :193-199.
- Kertesz M.A., A.M. Cook and T. Leisinger, 1994, Microbial metabolism of sulfur and phosphorus containing xenobiotics, *FEMS Microbiol. Rev.*, **15** : 195-215.
- Kolakowski J.E., J.J. Defranck, K. Lai and J.R. Wild, 1993, Hydrolysis of VX and its analogs by organophosphorus hydrolase, Communication to Scientific Conference on Chemical Defense Research, Maryland, USA.
- Kolakowski J.E., J.J. Defrank, S.P Harvey, L.L Szafraniec, W.T. Beaudry, K. Lai and J.R. Wild, 1997, Enzymatic hydrolysis of the chemical warfare agent VX and its neurotoxic analogues by organophosphorus hydrolase, *Biocat. Biotran.*, **15** : 297-312.
- Kostiainen R., A.P. Bruins and V.M.A. Hakkinen, 1993, Identification of degradation products of some chemical warfare by capillary electrophoresis ion spray mass spectrometry, *J. Chrom.* **634** : 113-118.
- Lai K., D.I. Kirti and J.R Wild, 1994, Bimetallic binding motifs in organophosphorus hydrolase are important for catalysis and structural organization. *J. Bio. Chem.*, **17** : 16579-16584.
- Lai K., N.J. Stolowich, J.R. Wild, 1995, Characterization of P-S bond hydrolysis in organophosphonate pesticides by organophosphorus hydrolase, *Arch. Biochem. and Biophys.*, **318** : 59-64.
- Lange and Von Krueger, 1932, *Ber.*, **65** : 1598-1932.
- Laplanche A., G. Martin, Y. Richard, 1961, Modélisation de l'évolution du parathion dans le milieu naturel sur un pilote de laboratoire, *Wat. Res.*, **15** : 599-607.
- Le Partourel G.N.J. and D.J. Wright, 1976, Formation of optically active metabolites of organophosphorus pesticide, phorate by nematodes and microorganisms, *Comp. Biochem. Physio.* **53C** : 73-74.
- Lee K.S., W.W. Metcalf and B.L. Wanner, 1992, Evidence for two phosphonate degradative pathways in *Enterobacter aerogenes*, *J. Bacteriol.*, **174** : 2501-2510.
- Little J.S., C.A Brommfield, M.K. Fox-Talbot, L.J. Bouchet, B. Maciver and D.E. Lenz, 1989, Partial characterization of an enzyme that hydrolyses sarin, soman, tabun and diisopropyl phosphorofluoridate, *Biochem. Pharmacol.* **38** : 23-29.
- Lydy M. J., T.W. Lohner and S.W. Ficher, 1990, Influence of pH, temperature and sediment type on the toxicity, accumulation and degradation of parathion in aquatic systems, *Aqua. Toxicol.*, **17** : 27-44.
- McGrath J.W., N.G. Terman and J.P. Quinn, 1997, Utilization of organophosphonates by environmental microorganisms, *Let. Appl. microbiol.*, **24** : 69-73.

- Main A.R., 1960, The purification of the enzyme hydrolysing diethyl p-nitrophenol phosphate (paraoxon) in sheep serum, *Biochem. J.*, **74** : 10-20
- Marvin H.J.P., B. Marvin, A.T. Beest and B. Witholt, 1989, Release of outer membrane fragments from wild type *Escherichia coli* and from several *E.coli* lipopolysaccharide mutants by EDTA and heat shock treatments, *J. Bacteriol.*, **171** : 5262-5267.
- Masson P., 1998, Conception par génie biomoléculaire d'épurateurs catalytiques des agents organophosphorés, Entretiens Science et Défense, Ed Cod'e, Alforville, France.
- Matsumura F. and G.M. Boush, 1968, Degradation of insecticides by soil fungus, *Trichoderma viride*, *J. Econ. Entomo.* **61**, 610-612.
- Mauret M. et L. Serph, 1994, Application d'une technique d'alimentation contrôlée en substrat pour la dégradation de xénobiotiques. Cas du paranitrophénol et du déméton. Rapport de recherche INSA Toulouse, 44 pages..
- Mazur A., 1946, An enzyme in animal tissue capable of hydrolysing the phosphorus-fluorine bond of alkyl fluorophosphates, *J. Biol. Chem.*, **16** : 4271-289.
- Marienfeld S., E.M Uhlemann, R. Schimid, R. Kramer and A. Burkovski, 1997, Ultrastructure of the *Corynebacterium glutamicum* cell wall, *A. V. Leeuwenhock*, **72** : 291-297.
- MeiZhen X., W. Wen-Xiang and M. Shao-Feng, 1992, Purification, identification and hydrolysing effect of soman of toad serum high density lipoprotein, Second international meeting on Esterases hydrolysing organophosphorus compounds, Salsomaggiore, Italy.
- Mengyue Z., C. Shifu and T. Yaowu, 1995, Photocatalytic degradation of organophosphorus pesticides using thin films of TiO₂, *Chem. Tech. Biotech.*, **64** : 339-344.
- Montel M.C., M.P. Seronie, R. Talon et M. Hébraud, 1994, Purification and characterization of a dipeptidase from *Lactobacillus sake*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**: 837,839.
- Moriya F., Y. Haschimoto, T.L. Kuo, 1999, Pitfalls when determining tissue distributions of organophosphorus chemicals : sodium fluoride accelerates chemical degradation, *J. Anal. Toxicol.*, **33** : 210-215.
- Mosfata I.Y., M.R.E Bahig, M.I. Fakha and Y. Adan, 1972, Metabolism of organophosphorus insecticides. Malathion breakdown by soil fungi, *Z. Naturforsch.*, **27b** : 1115-1116.
- Mounter L.A., 1953, Dialkylfluorophosphatase of kidney purification and properties, *J. Biol. Chem.*, **204** : 221-232.
- Mounter L.A., 1955, The distribution of dialkylfluorophosphatase in the tissues of various species, *J. Biol. Chem.*, **215** : 691-697.
- Mounter L.A. and K.D. Tuck, 1956, Dialkylfluorophosphatase of kidney. The hydrolysis of organophosphorus compounds, *J. Biol. Chem.* **219** : 685-690.

- Mounter L.A., 1963, Metabolism of organophosphorus anticholinesterase agent, Hanbush. Experimentellen. Pharmakologie., 486-504.
- Mulbry W.W. and J.S. Karns, 1989, Purification and characterisation of three parathion hydrolases from gram negative bacterial strains, Appl. Environ. Microbiol., **55** : 289-293.
- Mulbry W.W. and E. Rainina, 1998, Biodegradation of chemical warfare agents, ASM News., **646**: 325- 331.
- Munneke D.M. and D.P.H Hiesh, 1974, Microbial decontamination of parathion and p-nitrophenol in aqueous media, Appl. Microbiol., **28** : 212-217.
- Murphy S., Hay A. and S. Rose, 1984, No fire, no thunder, the threat of chemical and biological weapons. Pluto Press, 60-75
- Nelson L.M., B. Yaron and P.H. Nye, 1982, Biologically induced hydrolysis of parathion in soil. Isolation of hydrolysing bacteria, Soil. Biol. Biochem., **14** : 223-227.
- O'Brien R.D., 1960, Toxic phosphorus esters : chemistry, metabolism and biological effects. Academic press, 117-135.
- Oshiro K., T. Kakuta, T. Sakai, H. Hirota, T. Hoschino and T. Uchinyama, 1996, Biodegradation of organophosphorus insecticides by bacteria isolated from turf green soil, J. Ferment. Bioeng., **82** : 299-305.
- Omar S.A., A.M. Moharram and M.H. Abd-Alla, 1993, Effects of organophosphorus insecticide on the growth and cellulolytic activity of fungi, International Biodeterioration, **31** :105-110.
- Oplustil F., 1998 Development of the czech decontamination emulsions, Conference to NATO Advanced Research Workshop, Decontamination the basis for chemical agent, Buccharest, Romania.
- Ou L.T. and A. Sharma, 1989, Degradation of methyl parathion by a mixed bacterial culture and a Bacillus sp isolated from different soils, J. Agric. Food. Chem., **37** : 1514-1518.
- Paris D.F., D.L Lewis and N.L. Wolfe, 1975, Rates of degradation of malathion by bacteria isolated from aquatic system, Environ. Sci. Technol., **91** : 35-138.
- Pianetti G.A., M. Taverna, A. Baillet, G. Mahuzier and D. Baylocq-Ferrier, 1993, Determination of alkylphosphonic acids by capillary zone electrophoresis ionspray mass spectrometry, J. Chrom. **633** : 371-377.
- Pitter P. and J. Chudoba, 1990, Biodegradability of organic substances in the aquatic environment, CRC Press Florida, 235-248.
- Prevot P. and M.O. SoyerGobillard, 1987, The degradation of parathion in cultures of the marine dinoflagellate *Porocentrum micans*, Water. Res., **21** : 19-23.

- Racke K.D . and J.R. Coats, 1988, Comparative degradation of organophosphorus insecticides in soil: specificity of enhanced microbial degradation, *J. Agric. Food. Chem.*, **36** : 193-199.
- Rastogi V.K., J.J Defranck, T.C. Cheng and J.R. Wild, 1997, Enzymatic hydrolysis of russian VX by organophosphorus hydrolase, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **241** : 294-296.
- Registry of toxic effects of chemical substances, 1984, National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH), Ed D.H.S.S, 19.
- Richins R.D., I Kaneva A. Mulchandani and W. Chen, 1997, Biodegradation of organophosphorus pesticides by surface expressed organophosphorus hydrolase, *Nature. Biotechnol.*, **15** : 984-987.
- Rosenberg A. and M. Alexander, 1979, Microbial cleavage of various organophosphorus insecticides, *Appl. Environ. Microbiol.*, **37** : 886-891.
- Sauvegrain P., 1980, Les pesticides organophosphorés, Etude de synthèse de l'AFEE, Paris, 30 pages.
- Schowanek D. and W. Verstraete, 1990, Phosphonate utilization by bacterial cultures and enrichments from environmental samples, *Appl. Environ. Microbiol.*, **56** : 2501-2510.
- Schwarzenbach R.P., P.H. Gschwend and D.M. Imboden, 1993, Environmental organic chemistry, John Willey and Sons inc. Publishers, New-York, 681 pages. .
- Sethunathan N., 1973, Microbial degradation of insecticides in flooded soil and anaerobic cultures, *Residues Reviews.*, **47** : 143-165.
- Sethunathan N. and T. Yoshida, 1973, Parathion degradation in submerged rice soils in the Philippines, *J. Agric. Food. Chem.*, **21** : 504-506.
- Sharmila M., K. Ramanand and N. Shenuthan, 1989, Effect of yeast extract on the degradation of organophosphorus insecticides by soil enrichment and bacterial cultures, *Can. J. microbiol.*, **35** : 1105-1110.
- Simmonard A., 1986, Contribution à l'étude toxicologique des sels de N-alcoylimidazolium-pyridinium-carbaldoximes, Thèse d'état de l'Université René Descartes, Paris.
- Skoumal (1998) Czech decon emulsion, results, developments and tests, CBW Protection Symposium (Suède).
- Slater J.H. and A.T. Bull, 1982, Environnemental microbiology, Biodegradation, *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, **297** : 575-597.
- Smith D.K., C.D. Benedict and E.D. Wender, 1973, Bacterial culture longevity : control by inorganic phosphate and temperature, *App Microbiol.*, **27** : 292,293.
- Steffensen W.S and M. Alexander, 1995, Role of competition for inorganic nutrients in the biodegradation of mixtures of substrates, *Appl. Environ. Microbiol.*, **61** : 2859-2862.

- Swindoll C.M., M.C. Aelion and F.K. Pfaender, 1988, Influence of organic and inorganic nutrients on aerobic biodegradation and the adaptation response of substrate microbial communities, *App. Environ. Microbiol.*, **54** : 212-217.
- Szafraniec L.J., L.L. Szafraniec, W.T. Beaudry and J.R. Ward, 1990, On the stoichiometry of phosphonotriester hydrolysis, ERDECTR212, Rapport PRIC161102A7.
- Tangney M., P. Smith, F.G. Priest and W.J. Mitchell, 1992, Maltose transport in *Bacillus licheniformis* NCIB 6346, *J. Gen. Microbiol.*, **138** : 1821,1827.
- Tiedje J.M. and M. Alexander, 1969, Enzymatic cleavage of the ether bond of 2,4-dichlorophenoxyacetate, *J. Agric. Food. Chem.*, **17** : 1080-1099.
- Tonkopp V.D, 1997, New principles of xenobiotics biodegradation in fresh water, Advanced study institute, Bioavailability of organic xenobiotic in the environment, Jesenik, Czech Republic.
- Topfer H.J., 1998, Current aspects of decontamination of sensitive material, CBW Protection Symposium, Stockholm, Sweden.
- Topfer H.J, 2000, Pocket Handbook Nuclear biological chemical defense, Karcher Edition, 12-13.
- Torriani A., 1990, From cell membrane to nucleotides : the phosphate regulon in *Escherichia coli*, *Bioassays.*, **12** : 371-376.
- Trapp R., 1985, The detoxification and natural degradation of chemical warfare agents, Stocklom international peace institute, Taylor and Francis Ltd, London.
- Tsezos M. and X. Wang, 1991, Study on the kinetics of hazardous pollutants adsorption and desorption by biomass. Mechanistic considerations, *J. Chem. Tech. Biotech.* **50** : 507-521.
- Tu C.M. and J.R.W. Miles, 1976, Interactions between insecticides and soil microbes, *Residues. Reviews.*, **64** : 17-65.
- Verweij A. and H.L. Boter, 1976, Degradation of S2 diisopropylamino ethylomethyl phosphonothionate in soil, Phosphorus containing products, *Pest. Science.*, **7** : 355-362.
- Vial A., 1989, Devenir en milieu hydrique de 3 composés organophosphorés (parathion, soman, VX) et de leurs métabolites - Tests bactériens de toxicité et de dégradabilité. Thèse de doctorat de l'Université Montpellier 1, 201 pages.
- Vic A., 1991, De nouveaux outils en chimie fine, *Biofutur.*, **10** : 40-47.
- Walker W.W. and B.J. Stojanovic, 1974, Malathion degradation by an *Arthrobacter sp.*, *J. Environ. Qual.*, **3** : 4-10.
- Wanner B.L., 1993, Gene regulation by phosphate in enteric bacteria, *J. Cell. Biochem.*, **51** : 47-54.
- Wang F., M.Z Xiao, S.F. Mu, 1993, Purification and properties of a diisopropylfluorophosphate from squid *Todarodes pacificus*, *J. Biochem. Toxicol.* **8** : 161-166.

- White D.M and D. Marcus, 1988, Disintegration of microorganisms, Downstream processes, Editor Mizrahi, **8** : 51-96.
- Worek F., C. Dielold and P. Eyer, 1999, Dimethylphosphorylinhibited human cholinesterase : inhibition, reactivation and aging kinetics, Arch. Toxicol., **73** : 7-14.
- Yang Y., J.A. Baker and J.R Ward, 1992, Decontamination of chemical warfare agents, Chem. Rev., **92** : 1729-1743.
- Yasumo M., S. Hirakoso, M. Sata and M. Uchida, 1965, Inactivation of some organophosphorus insecticides by bacteria in polluted water, Jap. J. Exp. Med., **35** : 545-563.
- Zboinska L.D., I. Maliszewska, B. Lejczak and P. Kafarski, 1992, Degradation of organophosphonates by *Penicillium citrinum*, Lett. Appl. Microbiol., **15** : 269-272.
- Ziegler W., G. Engehardt, P.R. Wallnofer, L. Oehlmann and K. Wagner, 1980, Degradation of demeton-S-methyl sulfoxide (metasystox R) by soil microorganisms, J. Agric. Food. Chem., **281** : 1102-1106.
- Znamenskaya L.V., L.A. Gabdrakhmanova, E.B. Chernokalskaya, I.B. Leshninskaya and R.W. Hartley, 1995, Phosphate regulation of biosynthesis of extracellular Rnases of endosporeforming bacteria, FEBS, **357** : 16-18.





Nom, Prénom : HILAIRE Didier

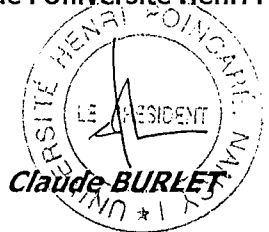
Nature de la thèse :

**Doctorat de l'Université Henri Poincaré, Nancy I
en Biologie et Santé**

VU, APPROUVE et PERMIS D'IMPRIMER

Nancy, le 30 mai 2001 n° 510

Le Président de l'Université Henri Poincaré, Nancy I



Résumé

La décontamination des matériels militaires contaminés par les armes chimiques pose problème car la majorité des solutions décontaminantes chimiques utilisées actuellement sont corrosives et dégradent de nombreux supports. La décontamination par voie enzymatique est une alternative respectueuse de l'intégrité des matériaux mais les enzymes disponibles ne permettent de détruire qu'une famille d'agents de guerre : les agents organophosphorés de type G (soman, sarin et tabun), ce qui limite son utilisation. L'objectif de ce travail est d'isoler une enzyme capable de dégrader les agents de guerre organophosphorés de type V dont le produit type est le VX, la dégradation des agents V consistant à hydrolyser leur liaison P-S. La démarche de cette étude a consisté à rechercher des micro-organismes capables de dégrader le VX lors de leur culture, puis à identifier le micro-organisme le plus efficace à détruire le VX. Un micro-organisme *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13745 a montré sa capacité à dégrader le VX ainsi que le déméton-S-méthyl et le tétriso. L'analyse ^{31}P RMN indique que la dégradation du VX et du tétriso se traduit par une rupture de la liaison P-S de ces composés alors que l'attaque du déméton-S-méthyl par la bactérie se situe au niveau de la liaison C-S. L'étude de la biodégradation du VX par *Corynebacterium glutamicum* montre que les vitesses de dégradation biologique augmentent avec la concentration de tampon phosphate et d'extrait de levure du milieu de culture. Les essais effectués en parallèle sur la dégradation abiotique du VX indiquent que le tampon phosphate favorise aussi la dégradation chimique du VX. Les essais effectués avec *Corynebacterium glutamicum* ont permis de localiser le système enzymatique qui hydrolyse la liaison P-S dans l'espace intra cellulaire. La purification enzymatique effectuée par chromatographie liquide a permis d'isoler un système enzymatique, appelé VXase, constitué de trois protéines dont une de poids moléculaire de l'ordre de 40 kD pourrait être l'enzyme responsable de l'hydrolyse de la liaison P-S. La caractérisation partielle de la VXase montre que cette enzyme possède une activité spécifique 10 fois supérieure à celle de la phosphotriestérase (OPH) seule enzyme décrite comme capable d'hydrolyser la liaison P-S. Nos résultats indiquent que la VXase n'est pas une OPH mais une nouvelle enzyme capable d'hydrolyser la liaison P-S.