



# Matrices nanoporeuses pour la détection de métabolites volatils microbiens par transduction optique directe

Marjorie Vrignaud

► **To cite this version:**

Marjorie Vrignaud. Matrices nanoporeuses pour la détection de métabolites volatils microbiens par transduction optique directe. Matériaux. Université Grenoble Alpes, 2015. Français. <NNT : 2015GREAV017>. <tel-01288232>

**HAL Id: tel-01288232**

**<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01288232>**

Submitted on 14 Mar 2016

**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.

## THÈSE

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES**

Spécialité : **Biotechnologie**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

**Marjorie VRIGNAUD**

Thèse dirigée par **Isabelle Texier-Nogues**

dans l'École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant

## **Matrices nanoporeuses pour la détection de métabolites volatils microbiens par transduction optique directe**

Thèse soutenue publiquement le **10 novembre 2015**,  
devant le jury composé de :

**M. Didier DELABOUGLISE**

Professeur, Université Grenoble-Alpes, Grenoble, Président

**M. Thibaud CORADIN**

Directeur de recherches CNRS, Collège de France, Paris, Rapporteur

**M. Hamid ELAISSARI**

Directeur de recherches CNRS, Université Lyon I, Lyon, Rapporteur

**Mme Isabelle TEXIER-NOGUES**

Ingénieur chercheur CEA, Grenoble, Examinatrice

**Mme Thu-Hoa TRAN-THI**

Directrice de recherches CNRS, NIMBE CEA Saclay, Gif-sur-Yvette,  
Examinatrice

**M. Jérôme POURTAU**

Ingénieur DGA, Bagneux, Examinateur

**M. Frédéric MALLARD**

Ingénieur bioMérieux, Grenoble, Examinateur

**M. Pierre MARCOUX**

Ingénieur chercheur CEA, Grenoble, Examinateur





## Résumé

La présence de microorganismes peut être révélée par des métabolites volatils caractéristiques. Cette approche est particulièrement intéressante pour la détection non-invasive de pathogènes dans des échantillons complexes comme les matrices alimentaires, les échantillons sanguins, ou encore les plaies chroniques. Des capteurs nanoporeux à grande surface spécifique ont été préparés par voie sol-gel (xérogels) ; leur rôle est à la fois de capturer, concentrer et permettre une détection optique des Composés Organiques Volatils (COV) microbiens. Des capteurs dopés avec une molécule sonde, l'acide 5,5'-dithiobis 2-nitrobenzoïque, ont été développés pour mettre en évidence le sulfure d'hydrogène (H<sub>2</sub>S) produit par *Salmonella*, un pathogène d'intérêt dans le domaine de l'agroalimentaire. La capture d'H<sub>2</sub>S provoque un changement de couleur du capteur dès 5 ppm. Une partie du travail de recherche porte également sur la détection de métabolites dits « exogènes », libérés suite à l'hydrolyse d'un substrat enzymatique. C'est alors l'activité enzymatique qui est spécifique du micro-organisme ciblé. Deux COV exogènes sont envisagés : le β-naphthylamine (β-NA) et le 2-nitrophénol (2-NP). Le premier est issu d'activités enzymatiques peptidases, le second est issu d'activités glycosidases ou estérases. Pour ce dernier, une détection directe est possible dès 14 ppb grâce à son absorbance intrinsèque dans le visible. Après un travail sur la composition chimique des xérogels, une mise en forme originale par moulage des gels en forme de coin de cube permet une lecture de l'absorbance des xérogels en réflexion. Enfin, les capteurs obtenus ont été testés vis-à-vis de COV générés par 3 pathogènes: *Salmonella*, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* dans des matrices complexes (sang et échantillons alimentaires).

**Mots clés :** sol-gel ; transduction optique; composés organiques volatils (COV) ; détection de bactéries ; sulfure d'hydrogène ; 2-nitrophénol ; β-naphthylamine.

## Abstract

The presence of micro-organisms can be revealed by specific volatile metabolites. This approach is interesting for the non-invasive detection of pathogenic species in complex samples, such as food, blood or exudate. Nanoporous materials developing a high surface area have been prepared by sol-gel process (xerogels). They trap, concentrate and reveal the presence of microbial Volatile Organic Compounds (VOC) by means of an optical detection. Sensors have been doped with a probe molecule (5,5'-dithiobis 2-nitrobenzoic acid) in order to detect hydrogen sulfide emitted by foodborne pathogen *Salmonella*. The colour of sensor changes in the presence of 5 ppm of H<sub>2</sub>S. Another detection method is the use of enzymatic substrates which release exogenous VOCs. In this approach, the enzymatic activity is specific to the targeted pathogenic bacteria. Sensors have been developed for two exogenous VOCs: β-naphthylamine (β-NA) and 2-nitrophenol (2-NP). β-NA is issued from peptidase activity, whereas 2-NP is produced by glycosidase or esterase activity. The latter can be detected above 14 ppb through absorbance in the visible region. The work focused both on the chemical composition of the xerogels and on their shape. After molding the xerogels into a trihedral prism ("corner reflector"), the absorbance can be easily monitored using the reflected light. VOCs produced by 3 pathogenic bacteria, *Salmonella*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, in complex media (blood and food samples) have been monitored with the obtained sensors.

**Keywords :** sol-gel ; optical transduction; volatile organic compounds (VOC) ; bacteria detection ; hydrogen sulfide ; 2-nitrophenol ; β-naphthylamine.



## Remerciements

Mes premiers remerciements s'adressent aux membres du jury qui ont accepté de lire avec soin ce manuscrit et de juger ce travail. Je remercie Thibaud Coradin et Hamid Elaissari et d'avoir accepté d'en être les rapporteurs. Je suis très reconnaissante envers Thu-Hoa Tran-Thi et Jérôme Pourtau d'avoir accepté de suivre régulièrement l'avancement de ces travaux ; les discussions ont toujours été très enrichissantes et leurs conseils précieux. Merci également à Didier Delabouglise et Frédéric Mallard d'avoir participé au jury de cette thèse.

Mes plus vifs remerciements vont à mon encadrant de thèse, Pierre Marcoux. Sa disponibilité et sa pédagogie m'ont permis de m'approprier rapidement mon sujet de thèse. Sa curiosité, sa créativité et sa passion pour la recherche sont très contagieuses et m'ont motivée tout au long de ces trois ans. Je le remercie pour tout ce qu'il m'a appris et en particulier, des bases expérimentales en microbiologie.

Un grand merci à ma directrice de thèse, Isabelle Texier-Nogues, pour m'avoir suivie tout au long de cette thèse malgré un emploi du temps déjà bien rempli. Merci pour ses précieux conseils et pour ses encouragements rassurants en particulier avant la soutenance.

Merci à Gilles Marchand de m'avoir accueillie au sein du Laboratoire de Chimie des Matériaux et Interfaces (LCMI) et à Pascal Mailley qui a pris sa suite. Je les remercie pour l'intérêt qu'ils ont porté à l'avancement de ces travaux.

Côté chimie, je suis très reconnaissante envers Séverine Vignoud ; d'un point de vue technique pour la gestion du BET et les discussions enrichissantes autour des matériaux ; mais aussi d'un point de vue plus personnel, pour ses conseils bienveillants et son écoute rassurante.

Un grand merci à Marie Escudé pour son accueil en travée 105 et la gestion du labo. Merci pour tes solutions à tous nos petits problèmes du quotidien. Grâce à toi, les commandes arrivent avec une efficacité inégalée. Les Pacha et DIA n'ont qu'à bien se tenir : les tableurs excel ultra-complexes et leur « erreurs » systématiques ne te font pas peur !

Merci aussi à Laure-Hélène Guillemot pour ses conseils, sa bienveillance et pour m'avoir appris son savoir-faire en sol-gel. Merci à Zoé Buniazet et son sourire avec qui c'était un plaisir de travailler sur les capteurs H<sub>2</sub>S.

Mes remerciements vont aussi à Véronique Mourier, Arnaud Lemelle et Tarek Fatallah pour les discussions sur nos matériaux respectifs et sur le moulage.

Ce projet pluridisciplinaire a pu progresser car j'ai été entourée de personnes aux multiples compétences :

Merci à Jean Hue, Mathieu Dupoy et Pierre Joly pour leurs conseils et leur aide lors de la mise en place des bancs optiques.

Merci à Thomas Bordy pour les bricolages divers et les programmes labview.

Merci à Raymond Charles pour l'usinage du réacteur, le résultat final est bien mieux que les plans que j'avais pu fournir !

Un grand merci aux membres de l'équipe mixte CEA-bioMérieux : Quentin, Armelle, Sophie, Delphine, Alice, Adrien. Merci de m'avoir accueillie dans vos laboratoires avec votre bonne humeur, votre sourire et votre humour.

Je n'oublie pas de remercier Guillaume Costa d'une part pour avoir été le meilleur voisin de bureau que l'on puisse espérer, mais aussi pour tous les petits coups de main au quotidien. Guillaume, je te souhaite le meilleur pour tout ce que tu entreprends !

De manière générale, je souhaite remercier les membres du LCMI et les habitants de la pièce 201. J'ai pris beaucoup de plaisir à travailler à vos côtés. Merci pour votre accueil et votre bonne humeur, je garderai un très bon souvenir de ces trois ans avec vous. J'ai pu constater que les bons chimistes sont aussi de très bons pâtisseries : merci pour vos recettes ! Je retiens entre autres les macarons et canistrelli de Séverine, la tarte tatin et le pain d'épice de Guillaume C, le far breton de Guillaume N, les cannelés de Claire, le gâteau roulé de Mathieu, les gâteaux au chocolat de Julien, les muffins de Loulou, le creusois de Jess... Merci aussi à Anne-Claude pour l'orchidée-sitting.

Un petit clin d'œil aux joggeurs du midi pour leur motivation presque sans faille par tous les temps: Lisa, Jess, Thomas, Vence, David, Sandra, Loulou....J'ai adoré arpenter avec vous les berges du Drac et les Vouillants même si les après-midi qui suivaient étaient particulièrement laborieuses !

Enfin, je n'oublie pas tous ceux avec qui j'ai passés de bons moments : Jess, Lisa, Claire, Julien, Louise, Hélène, David, Mathieu, Maxime, Mélanie, Fabien, John, Emilie Bisceglia, Emilie Perret, Emilie Bayon, Julie, Gaëtan.

J'espère que ces remerciements sont exhaustifs, sinon, je m'excuse par avance auprès de ceux que j'aurai oubliés.

Pour finir, merci à Adrien pour ton soutien, et pour l'intérêt que tu as porté à mon sujet pendant ces trois ans. Merci aussi pour ton calme et ta zénitude à toute épreuve qui nous ont permis de vivre nos derniers mois de thèse sereinement.

## Liste des abréviations

ABTES	4-aminobutyltriéthoxysilane
ADN	Acide désoxyribonucléique
$\alpha$ -GLU-2-NP	Substrat enzymatique 2-nitrophényl- $\alpha$ -glucopyranoside
APTES	3-aminopropyltriéthoxysilane
ARN	acide ribonucléique
ATCC	American Type Culture Collection
BET	méthode de Brunauer, Emmett et Teller pour la détermination de la surface spécifique
$\beta$ -GUR-2-NP	Substrat enzymatique 2-nitrophényl- $\beta$ -D-glucuronide
BJH	modèle Barrett, Joyner et Halenda
$\beta$ -NA	$\beta$ -naphthylamine
COS	Gélose Columbia + sang de mouton
COV	Composé Organique Volatil
CSV	Composé Volatil Soufré
Cfu	unité formant colonie
C <sub>8</sub> -2-NP	Substrat enzymatique 2-nitrophényl caprylate
DDL	3,5-diacétyl-1,4-dihydrolutidine
DFT	théorie de la fonctionnelle de densité
DMACA	para-diméthyl-aminocinnamaldéhyde
DMPD	N,N-diméthyl-para-phénylènediamine
DO	Densité Optique
DTNB	acide 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoïque)
EPT	Eau Peptoné Tamponnée
EtOH	éthanol
FID	détecteur à ionisation de flamme
FTMOS	trimethoxy(3,3,3-trifluoropropyl)silane
GC	Gaz Chromatography, chromatographie en phase gazeuse
GSSG	disulfure de glutathion
H <sub>cc</sub>	Constante de Henry
HLB	Hydrophilic/Lipophilic Balance
IMS	Ion Mass Spectrometry, spectrométrie de masse à ionisation
LED	Light Emitting Diode, diode électroluminescente
MALDI-TOF MS	Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry
MCOV	Composé Organique Volatil Microbien
MeOH	méthanol
MES	acide 2-(N-morpholino)éthanesulfonique
MKTTn	bouillon de Müller-Kauffmann au Tétrathionate-Novobiocine
MOS	Metal Oxide Semiconductor
MRSA	Methicilin Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
MS	spectrométrie de masse
NAD	Nicotinamide Adénine Dinucléotide

no	Nombre d'oxydation
2-NP	2-nitrophénol
4-NP	4-nitrophénol
NTCC	National Collection of Type Cultures
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDMS	Polydiméthylsiloxane
PhTMOS	p-aminophenyltriméthoxysilane
ppb	partie par billion
ppm	partie par million
RVS	bouillon Rappaport-Vassiliadis
SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
SDS	laurylsulfate de sodium
SPME	Solid Phase Micro-Extraction, micro-extraction sur phase solide
SPR	résonance plasmonique de surface
TMOS	tétraméthylorthosilicate
TNB	acide 2-nitro-5-thiobenzoïque
TSA	Tryptic Soy Agar, gélose trypticase soja
Ufc	Unité Formant Colonie
UV	ultra-violet
XLD	gélose Xylose-Lysine-Désoxycholate

RESUME .....	I
LISTE DES ABREVIATIONS .....	VII
<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>1</b>
<b>CHAPITRE 1. PROBLEMATIQUE : LA DETECTION ET L'IDENTIFICATION DE MICRO-ORGANISMES PATHOGENES. . 5</b>	<b>5</b>
1. PROBLEMATIQUE ET CONTEXTE .....	7
2. NOTRE APPROCHE : LES COMPOSES ORGANIQUES VOLATILS MICROBIENS (MCOV) .....	15
3. DETECTION OPTIQUE DE COV DANS DES XEROGELS.....	19
4. LES SUBSTRATS ENZYMATIQUES.....	24
5. LES SUBSTRATS ENZYMATIQUES OSMOGENES.....	29
6. PRESENTATION DU SUJET DE THESE.....	32
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	34
<b>CHAPITRE 2. DETECTION DE COMPOSES SOUFRES VOLATILS (CSV).....</b>	<b>39</b>
1. PERTINENCE DES CSV POUR LA DETECTION DE MICRO-ORGANISMES .....	41
2. METHODES DE DETECTION DES VSC, EN PARTICULIER H <sub>2</sub> S .....	44
3. CHOIX DE LA MOLECULE SONDE.....	48
4. ETUDE DE LA REACTION ENTRE LE REACTIF D'ELLMAN ET LES VSC EN MILIEU AQUEUX.....	52
5. SYNTHÈSE ET CARACTERISATIONS DES CAPTEURS DOPES AU DTNB.....	53
6. EXPOSITION DES CAPTEURS A DES VSC GENERES CHIMIQUEMENT .....	57
7. MISE EN ŒUVRE DANS LA DETECTION DE VSC BACTERIENS.....	61
CONCLUSION .....	75
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	77
<b>CHAPITRE 3. DETECTION D'UNE AMINE AROMATIQUE VOLATILE EXOGENE : LA <math>\beta</math>-NAPHTHYLAMINE .....</b>	<b>81</b>
1. LES COV EXOGENES : GENERALITES .....	83
2. CHOIX DE L'AMINE VOLATILE EXOGENE : LA $\beta$ -NAPHTHYLAMINE .....	86
3. DETECTION DE LA B-NAPHTHYLAMINE EN ABSORBANCE APRES REACTION AVEC UNE MOLECULE SONDE.....	86
4. DETECTION DE LA $\beta$ -NAPHTHYLAMINE EN FLUORESCENCE.....	98
CONCLUSION .....	101
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	103
<b>CHAPITRE 4. DETECTION DE PHENOLS VOLATILS EXOGENES.....</b>	<b>105</b>
1. CHOIX DU COV .....	107
2. SYNTHÈSE ET CARACTERISATION DE XEROGELS POUR LA DETECTION DU 2-NITROPHENOL .....	111
3. DETECTION DU 2-NITROPHENOL DANS UNE MATRICE SIMPLE : L'EAU TAMPONNEE .....	120
4. DETECTION DU 2-NITROPHENOL DANS DES MATRICES COMPLEXES .....	126
5. SUIVI DE LA PRODUCTION DE 2-NITROPHENOL PAR HYDROLYSE DE SUBSTRATS ENZYMATIQUES DANS DES MILIEUX SIMPLES ....	130
6. DETECTION EN PHASE GAZEUSE DE 2-NITROPHENOL ISSU D'UNE HYDROLYSE ENZYMATIQUE DANS UN MILIEU COMPLEXE .....	141
CONCLUSION .....	162
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	164
<b>CHAPITRE 5. MISE EN FORME DES XEROGELS POUR UNE LECTURE EN REFLEXION .....</b>	<b>167</b>
1. LES RETROREFLECTEURS « COINS DE CUBE ».....	169
2. LE MOULAGE DES XEROGELS.....	172
3. FORMULATION DES GELS : AJUSTEMENT DE L'INDICE DE REFRACTION.....	175

4.	EXPOSITION DES RETROREFLECTEURS A DU 2-NP GENERE CHIMIQUEMENT .....	194
5.	SUIVI DE LA CAPTURE DE 2-NITROPHENOL GENERE PAR LA DEGRADATION D'UN SUBSTRAT ENZYMATIQUE. ....	197
	CONCLUSION .....	199
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	201
	<b>CONCLUSION GENERALE .....</b>	<b>203</b>
	<b>ANNEXES .....</b>	<b>207</b>
	ANNEXE 1 : ELEMENTS DE MICROBIOLOGIE .....	208
	ANNEXE 2 : DEFINITIONS D'UN COMPOSE ORGANIQUE VOLATIL ET DE LA CONSTANTE DE HENRY .....	214
	ANNEXE 3 : PROTOCOLE DE SYNTHESE DES XEROGELS .....	216
	ANNEXE 4 : CARACTERISATION DE LA POROSITE D'UN MATERIAU PAR ADSORPTION-DESORPTION D'AZOTE .....	221
	ANNEXE 5 : DOSAGE DE L'EAU DANS LES XEROGELS AVEC LE PROCEDE KARL-FISCHER .....	227
	ANNEXE 6 : PROTOCOLE D'EXPOSITION AUX COMPOSES VOLATILS .....	229
	ANNEXE 7 : COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURE .....	235
	ANNEXE 8 : LA REGULATION DE LA PRODUCTION D'ENZYMES .....	240
	ANNEXE 9 : MONTAGE POUR UNE MESURE D'ABSORBANCE EN DIFFERENTS POINTS D'UN XEROGEL.....	244
	ANNEXE 10 : DETERMINATION DES LIMITES DE DETECTION .....	246
	ANNEXE 11 : MESURE DES INDICES DE REFRACTION .....	249
	ANNEXE 12 : CARACTERISATIONS DES XEROGELS MIXTES SI-ZR (POROSITE, INDICE DE REFRACTION) .....	251
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	255

# Introduction générale

---

Parmi l'immense diversité du métabolome bactérien, les métabolites volatils génèrent un intérêt croissant car l'ensemble des composés gazeux émis par un micro-organisme constitue une forme « d'empreinte olfactive ». L'analyse de cette dernière peut permettre une identification non invasive et sans marquage. Dans ce cadre, notre étude a pour objectif la mise au point de capteurs de COV microbiens à transduction optique (absorbance ou fluorescence), à bas coût et d'utilisation facile. Ces capteurs sont des matrices nanoporeuses synthétisées par voie sol-gel (xérogels). Ces matériaux sont dotés d'une grande surface spécifique et peuvent contenir une molécule sonde capable de réagir spécifiquement avec le COV ciblé pour former un composé absorbant ou fluorescent. La thèse se donne pour objectif d'intervenir à la fois en amont, sur la composition chimique et la mise en forme des xérogels et en aval, sur l'instrumentation optique et sur la mise au point des milieux de culture.

Cette approche basée sur les COV microbiens est adaptée à la détection de pathogènes dans des échantillons complexes. Pour ces échantillons, une détection optique dans le milieu même est difficile voire impossible du fait de leurs propriétés optiques défavorables (diffusion, absorbance, fluorescence). Nous nous intéresserons en particulier à la détection de pathogènes dans deux types d'applications : le contrôle des matrices alimentaires et les hémocultures.

Deux stratégies sont exploitées. La première est la détection de métabolites endogènes volatils spécifiques de pathogènes d'intérêt. Les COV endogènes sont issus du métabolisme des micro-organismes. Il s'agit le plus souvent d'amines, de dérivés soufrés, d'acides carboxyliques, d'aldéhydes ou encore de cétones. Notre étude porte sur les composés soufrés volatils, et plus particulièrement sur le sulfure d'hydrogène H<sub>2</sub>S.

La deuxième stratégie est la détection de COV exogènes issus de l'hydrolyse d'un substrat par une enzyme spécifique. Cette approche permet de choisir le COV à détecter. Il est sélectionné pour ses propriétés optiques intrinsèques, ce qui évite l'emploi d'une molécule sonde, et pour ses propriétés physicochimiques, comme sa constante de Henry par exemple. Enfin, le COV exogène cible peut être libéré par hydrolyse de substrats variés, permettant ainsi de cibler diverses espèces avec un même capteur.

Le premier chapitre aborde les méthodes classiques et émergentes pour la détection et l'identification de micro-organismes.

Le deuxième chapitre traite de la mise au point d'un capteur de composés soufrés volatils pour la mise en évidence du sulfure d'hydrogène produit par *Salmonella*, un pathogène bien connu dans le domaine de l'agroalimentaire. Le capteur est doté d'une molécule sonde réagissant avec les composés soufrés, de manière à former *in situ* une molécule absorbant fortement dans le visible.

Le troisième chapitre porte sur le développement de capteurs pour la β-naphthylamine, une amine aromatique exogène issue de l'hydrolyse de peptides. Deux modes de détection sont envisagés : en absorbance après réaction avec une molécule sonde, et en fluorescence sans molécule sonde.

Le quatrième chapitre décrit la mise au point d'un capteur pour le 2-nitrophénol. Ce deuxième COV exogène a été choisi pour mettre en évidence l'hydrolyse de substrats par des enzymes glycosidases

ou estérases. Le 2-nitrophénol est mis en évidence sans molécule sonde grâce à son absorbance intrinsèque dans le visible.

Enfin, le cinquième chapitre est dédié à une mise en forme originale des capteurs en forme de coin de cube (appelé aussi « prisme trihédral »). Cette configuration permet de suivre l'absorbance des xérogels grâce à la lumière réfléchiée sur les trois faces orthogonales du coin de cube et de simplifier ainsi l'instrumentation. Des travaux innovants de formulation et de mise en forme ont été nécessaires pour obtenir des capteurs répondant au cahier des charges.

Les capteurs préparés ont été testés en premier lieu vis-à-vis de COV générés chimiquement, puis vis-à-vis d'atmosphères générées par des cultures bactériennes.



# Chapitre 1. Problématique : la détection et l'identification de micro-organismes pathogènes.

---

**CHAPITRE 1. PROBLEMATIQUE : LA DETECTION ET L'IDENTIFICATION DE MICRO-ORGANISMES PATHOGENES. 5**

1.	PROBLEMATIQUE ET CONTEXTE	7
1.1	<i>Méthodes de détection</i>	8
1.2	<i>Méthodes d'identification</i>	12
1.2.1	Méthodes d'orientation	12
1.2.2	Identification par étude du métabolisme bactérien	12
1.2.3	Identification par voie génomique	13
1.2.4	Identification par spectroscopies	13
2.	NOTRE APPROCHE : LES COMPOSES ORGANIQUES VOLATILS MICROBIENS (MCOV)	15
2.1	<i>L'analyse des composés volatils pour le diagnostic</i>	15
2.2	<i>Les techniques d'analyse des composés volatils</i>	16
2.2.1	La chromatographie en phase gazeuse	16
2.2.2	Les nez électroniques	17
3.	DETECTION OPTIQUE DE COV DANS DES XEROGELS	19
3.1	<i>Formation d'un réseau d'oxyde poreux par chimie sol-gel</i>	19
3.2	<i>Des matériaux préparés par voie sol-gel pour la détection optique de composés organiques volatils</i>	21
3.2.1	Détection par luminescence	21
3.2.2	Détection par absorption	22
4.	LES SUBSTRATS ENZYMATIQUES	24
4.1	<i>Généralités</i>	24
4.2	<i>Utilisation de substrats enzymatiques pour l'identification de micro-organismes</i>	26
4.3	<i>La régulation de la production d'enzymes</i>	28
5.	LES SUBSTRATS ENZYMATIQUES OSMOGENES	29
5.1	<i>Interêt</i>	29
5.2	<i>Utilisation de substrats osmogènes pour le diagnostic</i>	29
5.2.1	Substrats osmogènes pour l'hémoculture	29
5.2.2	Substrats osmogènes pour détecter l'activité uréase d' <i>Helicobacter pylori</i>	30
5.2.3	Substrats osmogènes pour la détection d'activités enzymatiques glycosidases	30
6.	PRESENTATION DU SUJET DE THESE	32
6.1	<i>Choix des MCOV</i>	32
6.2	<i>Stratégie pour l'élaboration des capteurs</i>	32
	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	34

## 1. Problématique et contexte

La détection et l'identification de bactéries pathogènes revêt une grande importance dans de nombreux domaines tels que la santé et l'industrie agroalimentaire.

**En microbiologie clinique** La microbiologie doit répondre à des enjeux de santé publique majeurs tels que le développement des résistances bactériennes ou l'apparition de nouveaux pathogènes. Les échantillons cliniques peuvent être de nature très variable : prélèvements sur une plaie, nasal, vaginal *etc.* à l'aide d'écouvillons ou prélèvements de sang ou d'urine. Les pathogènes ciblés sont très divers et les charges bactériennes sont souvent faibles (par exemple, la concentration bactérienne moyenne dans une hémoculture est de quelques cfu/mL). Un isolement sur un milieu gélosé permet d'une part de séparer les bactéries pathogènes de la flore locale et/ou des cellules du patient. D'autre part, il permet d'augmenter la biomasse, en effet, les tests actuels d'identification requièrent un grand nombre de cellules. A partir de cet isolement, l'espèce est identifiée grâce à des tests biochimiques qui reposent sur certains caractères phénotypiques. En parallèle du test d'identification est réalisé un test de susceptibilité aux antibiotiques (ou « antibiogramme »).

**En microbiologie industrielle** Dans des domaines comme l'industrie pharmaceutique ou cosmétique des tests de stérilité sont souvent nécessaires. Dans l'industrie agroalimentaire, de multiples micro-organismes (bactéries, virus, parasites) sont susceptibles de contaminer les denrées alimentaires et d'engendrer diverses pathologies. [1] Les intoxications alimentaires dues à la présence de micro-organismes représentent un réel enjeu de santé publique. Certaines espèces sont particulièrement recherchées (Tableau 1.1). En plus des enjeux sanitaires, il existe de réels enjeux économiques puisqu'un rappel de lots en cas de contamination est très coûteux. Dans ce domaine, la difficulté repose sur le fait de séparer les pathogènes de la flore locale qui peut être abondante. Les méthodes de détection se déroulent en trois étapes : une première étape d'enrichissement dans un milieu non sélectif a pour but d'augmenter la concentration de tous les micro-organismes. La deuxième étape est un enrichissement sélectif dans un milieu spécifique pour favoriser la croissance du pathogène recherché par rapport à la flore dite « locale » (*i.e.* naturellement présente dans l'aliment). Enfin, à partir de cette culture, un isolement est réalisé sur un milieu gélosé en général sélectif lui-aussi, suivi de tests de confirmation (biochimiques ou sérologiques). [2]

Pour des espèces comme *Escherichia coli*, une charge bactérienne seuil est acceptée ; un comptage (ou « numération ») est alors nécessaire et aucun enrichissement préalable à la numération ne peut avoir lieu. En revanche, pour d'autres espèces comme *Salmonella* ou des souches à toxines comme *Escherichia coli* O157 H7, la charge bactérienne acceptée est nulle. On peut alors dans ce cas procéder à un enrichissement puisque l'information de la charge bactérienne initiale dans l'aliment n'a aucune valeur.

<b>Pathogène</b>	<b>Milieu de croissance</b>	<b>Dose pathogène</b>	<b>Nom de la maladie</b>
<b><i>Campylobacter jejuni</i></b>	Lait, viande crue, volaille, coquillages	400-500 cellules	Campylobactériose
<b><i>Salmonella spp.</i></b>	Œufs, volaille et viande, produits laitiers, fruits de mer, chocolat, salade et épices	15-20 cellules	Salmonellose
<b><i>Escherichia coli</i></b>	Œufs, volaille et viande, produits laitiers, fruits de mer, légumes à feuilles	< 10 cellules	Coliques hémorragiques
<b><i>Listeria monocytogenes</i></b>	Fromage frais, lait, viande et volaille, légumes à feuilles	< 1000 cellules	Listériose
<b><i>Clostridium botulinum</i></b>	Conserves mal réalisées, produits sous vide	< ng de toxine botulique	Botulisme
<b><i>Clostridium perfringens</i></b>	Viandes mal cuites ; sauce de viande	> 10 <sup>8</sup> cellules	Empoisonnement au <i>perfringens</i>
<b><i>Shigella</i></b>	Salade, légumes crus, produits laitiers et volaille	< 10 cellules	Shigellose

**Tableau 1.1 : Principaux pathogènes responsable de toxi-infections alimentaires [1]**

## 1.1 Méthodes de détection

On distingue les tests de stérilité qui consistent à déterminer la présence ou l'absence de micro-organismes viables, et les tests de détection d'une espèce en particulier.

Les tests de stérilité sont notamment courants dans l'industrie pharmaceutique ou dans le domaine des dispositifs médicaux. Les hémocultures qui ont pour objectif la détection de pathogènes dans le sang sont aussi un exemple de tests de stérilité. Avant l'apparition d'automates, les échantillons étaient incubés dans un milieu nutritif, en conditions aérobies et anaérobies, et observés une fois par jour pendant au minimum dix jours. L'apparition d'un trouble dû à une concentration élevée en bactéries était le signe d'une pousse. Aujourd'hui, de nombreux automates ont vu le jour pour effectuer des tests de stérilité, et ont permis de diminuer le temps de détection des micro-organismes. Ces techniques sont souvent basées sur la détection de produits du métabolisme (détection du CO<sub>2</sub> ou détection en impédance de petites molécules chargées).

D'autres méthodes permettent de cibler une espèce en particulier, c'est le cas de la résonance plasmonique de surface où une molécule (protéine, anticorps ou bactériophage) se lie de façon spécifique avec le micro-organisme recherché.

**Détection colorimétrique du CO<sub>2</sub>** La détection du CO<sub>2</sub> est une méthode de choix puisque qu'il s'agit d'un métabolite rejeté par tous les micro-organismes. Depuis les premiers automates d'hémoculture à la fin des années 70, plusieurs appareils automatisés sont commercialisés et basés sur différentes techniques. Par exemple, dans les flacons commercialisés par BioLumix, le CO<sub>2</sub> émis par les micro-organismes diffuse dans une matrice solide polymère située dans le fond du flacon. Le CO<sub>2</sub> forme alors de l'acide carbonique H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> qui acidifie le milieu ; une sonde chromophore de pH dans la matrice solide change alors de couleur. C'est aussi le principe du BacT/Alert 3D de bioMérieux, la matrice solide devient plus claire lorsque le pH diminue et la quantité de lumière réfléchie augmente.

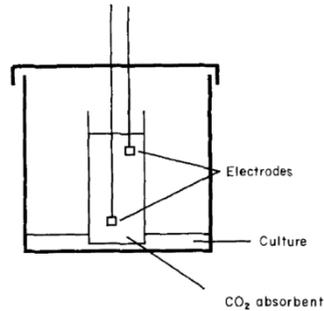


Figure 1.1 : Flacons pour la détection du CO<sub>2</sub> émis par les micro-organismes. A) flacon BioLumix, [3] B) flacon BacT/Alert. [4]

**Détection en impédance** L'impédance est la résistance que subit un courant alternatif pour traverser un milieu conducteur. Elle peut être écrite comme :  $Z = R + i X$ . La partie réelle  $R$  est la résistance, responsable de l'effet Joule. La partie imaginaire  $X$  est la réactance, responsable du déphasage entre la tension et l'intensité. On définit la conductance comme l'inverse de la résistance :  $G = \frac{1}{R}$  (en Siemens).

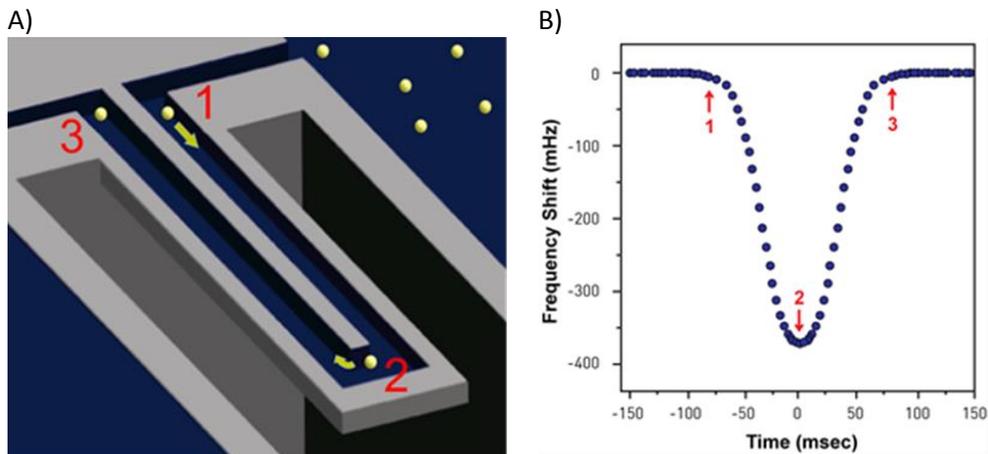
Au cours du métabolisme bactérien, des nutriments du milieu sont dégradés en molécules plus petites, plus mobiles et avec une charge plus élevée. Par exemple, des protéines sont dégradées en acides aminés et des polymères osidiques en lactates. Au cours de la multiplication bactérienne, cette production d'ions devient suffisante pour provoquer une modification significative de la conductance du milieu. On distingue deux types de mesures d'impédance. La première, est une mesure directe des variations d'impédance du milieu : les électrodes sont plongées dans le milieu de culture même. La deuxième est une mesure indirecte utilisée lorsque les milieux sont très concentrés en sels. C'est le cas par exemple du Rappaport-Vassiliadis (milieu pour l'enrichissement sélectif de *Salmonella*) qui contient une grande quantité de chlorure de magnésium (MgCl<sub>2</sub>). Dans ce cas, les électrodes ne sont pas au contact direct du milieu, mais d'une solution de soude. Une partie du CO<sub>2</sub> produit par les micro-organismes se volatilise dans le volume mort puis se dissout dans la solution de soude. Il se forme alors des ions carbonates, d'où une modification de l'impédance de la solution. [5][6] Quatre systèmes sont

disponibles commercialement : Le Bactometer (bioMérieux), le BacTrac (Sy-Lab), le Malthus (Malthus Instruments) et le RABIT (Rapid Automated Bacterial Impedance Technique, Don Whitley Scientific).



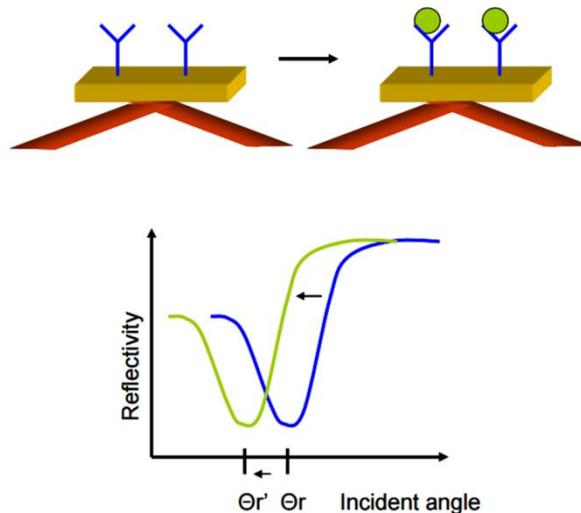
**Figure 1.2 : Suivi en impédance indirecte du CO<sub>2</sub> produit par des micro-organismes : le CO<sub>2</sub> issu de la culture se dissout dans une solution de soude. La formation d'ions carbonates modifie l'impédance de la solution. [6]**

**Détection cantilever** Il est aussi possible de mettre en évidence la présence de micro-organismes grâce à leur masse en utilisant une micro-poutre cantilever dans laquelle passe un canal avec un flux de solution. Une fréquence de résonance est imposée à la poutre ; lorsqu'un micro-organisme passe dans le canal, la masse sur la poutre augmente et provoque une diminution de la fréquence. La résolution est telle, qu'il est possible de détecter un changement de masse de l'ordre du femtogramme ( $10^{-18}$  g). Avec une telle sensibilité, il est possible de détecter le passage d'une cellule unique sur la poutre. Il est aussi possible de réaliser un comptage en connaissant le volume total de solution passant dans le canal. [7][8] Cependant, ce système connaît des limitations, en particulier dans des applications où de gros volumes doivent être traités, puisque le débit dans le canal est de 100 nl/min.



**Figure 1.3 : Principe de la détection avec une poutre cantilever. A) Représentation schématisée du passage d'un micro-organisme dans le canal sur la poutre cantilever. B) Signal correspondant au passage d'un micro-organisme. L'amplitude donne accès à la masse et le temps entre les points 1 et 3 correspond au temps de transit. [8]**

**Résonance plasmonique de surface (SPR)** D'après la loi de Descartes, lorsqu'un rayon lumineux arrive à l'interface entre deux matériaux 1 et 2 avec des indices de réfraction respectivement  $n_1$  et  $n_2$  ( $n_1 > n_2$ ), si l'angle d'incidence est supérieur à l'angle critique, alors le rayon est totalement réfléchi. Lorsqu'une réflexion totale a lieu, une onde évanescente est créée à l'interface, son intensité décroît exponentiellement avec la distance à l'interface. La distance de propagation de cette onde est de l'ordre de sa longueur d'onde. Elle est donc très sensible aux modifications qui ont lieu à la proximité de l'interface. Les photons de cette onde évanescente peuvent entrer en résonance (résonance plasmonique de surface, SPR) avec des électrons libres d'une fine couche de métal (de l'or par exemple). Les conditions pour obtenir cette résonance dépendent de la longueur d'onde, de la polarisation et de l'angle d'incidence. En mesurant l'intensité de la lumière réfléchie en fonction de l'angle d'incidence, un minimum apparaît à l'angle de résonance. Un changement de la densité à la surface modifie l'indice de réfraction du milieu dans lequel se propage l'onde évanescente, donc modifie l'angle de résonance. Cette propriété est utilisée notamment pour détecter la liaison d'un analyte à un ligand fixé à la surface d'un prisme recouvert d'or.



**Figure 1.4 : Principe de la résonance plasmonique de surface. Effet de la liaison entre un ligand et un analyte sur une surface d'or. Cette liaison provoque une modification de l'indice de réfraction, donc de l'angle de résonance. [9]**

Cette technique commence à faire ses preuves pour la détection spécifique de bactéries pathogènes dans des échantillons de nourriture. Des ligands sont fixés sur la surface d'or des prismes et se lient spécifiquement aux bactéries ciblées. Ces ligands peuvent être des anticorps, des bactériophages ou des lectines (des protéines qui se lient spécifiquement à certains glucides). [10][11] Des systèmes bas coût en plastique et miniaturisés ont été développés afin de commercialiser un appareil de diagnostic. Des pathogènes d'intérêt pour l'industrie agroalimentaire comme *Salmonella spp*, *Salmonella enteritidis* et *Salmonella typhimurium* sont détectés après une étape d'enrichissement. [12]

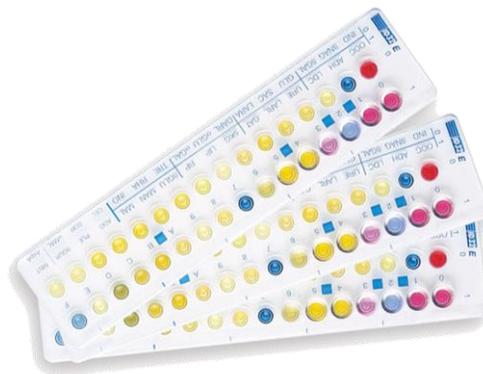
## 1.2 Méthodes d'identification

### 1.2.1 Méthodes d'orientation

Historiquement, l'identification des micro-organismes était basée sur des observations macroscopiques des colonies (forme, couleur, granulosité,) couplées à des observations microscopiques comme la mobilité ou les colorations de Gram ou de Ziehl-Neelsen qui classifient les bactéries en fonction des propriétés de leurs parois. Aujourd'hui les tests d'orientation comme la coloration de Gram, le test de l'oxydase et le test de la catalase permettent de classer préalablement le pathogène inconnu dans des vastes groupes (*e.g.* bacille Gram négatif Oxydase négatif) avant de procéder à des tests plus précis.

### 1.2.2 Identification par étude du métabolisme bactérien

Les méthodes conventionnelles sont fondées sur une série de tests biochimiques exploitant les caractéristiques métaboliques des espèces bactériennes. Les années soixante-dix ont vu apparaître des galeries comportant plusieurs tests. [13] Ces galeries sont constituées de cupules remplies de réactifs lyophilisés que l'on réhydrate par ajout d'une suspension réalisée à partir d'un clone prélevé sur la boîte d'isolement. Après 18 à 24 heures d'incubation à 37°C, les résultats (+ ou -) des tests sont comparés à une base de données du fournisseur établie à partir de souches de référence. Les systèmes commercialisés sont les Galeries API (bioMérieux), Enterotube II (Becton Dickinson), ou encore Micro-ID (Thermo-Scientific). Le choix du système à employer s'effectue d'après les résultats des tests d'orientation : par exemple, une galerie API Staph s'utilise sur un coque à Gram + catalase +, un Enterotube II s'emploie sur un bacille à Gram – oxydase -.



**Figure 1.5 : Galeries API ID32 (bioMérieux). Chaque galerie comporte une série de tests biochimiques. Il existe 15 systèmes d'identification afin de couvrir tous les groupes bactériens. [14]**

Plus tard, les industriels du diagnostic ont automatisé ces systèmes. Des appareils comme les automates Vitek (bioMerieux), ou Phoenix (Becton Dickinson) permettent une automatisation des étapes de remplissage, d'incubation, de lecture et d'interprétation des tests. Ces systèmes comparent le profil obtenu de la souche inconnue avec ceux de leurs banques de données. Certains automates peuvent réaliser simultanément un antibiogramme dans un autre consommable analogue muni des réactifs adaptés. Ces techniques restent tributaire d'une étape de culture afin d'avoir une biomasse suffisante : typiquement, ces tests requièrent 1 à 3 mL de suspension à 0,5 McF, ce qui représente  $10^6$  à

$10^8$  cellules bactériennes. Les nouvelles méthodes en développement visent à identifier des biomasses bien plus faibles,  $10^4$  ou  $10^3$  bactéries, voire moins.

### **1.2.3 Identification par voie génomique**

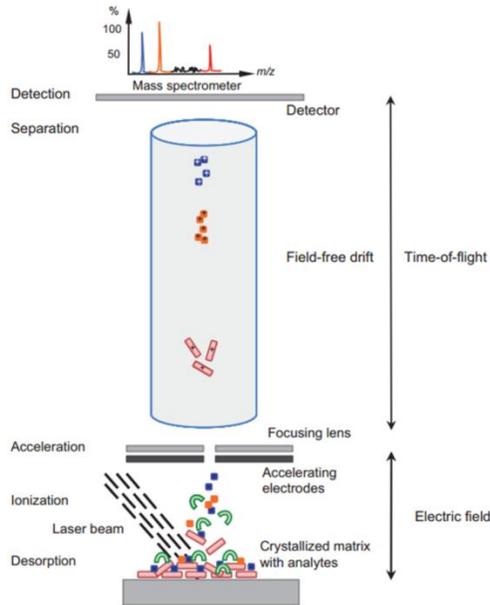
Plus récemment, les méthodes génomiques ont vu le jour. Elles permettent l'identification d'un micro-organisme par reconnaissance d'une partie de son matériel génétique. Le principe est le suivant :

- Lyse des micro-organismes et extraction des acides nucléiques
- Amplification d'une séquence d'acides nucléiques (le plus souvent par PCR : Polymerase Chain Reaction). Cette méthode permet de dupliquer en grand nombre une séquence d'ADN ou d'ARN. Pour que cette duplication soit sélective, les amorces utilisées sont des courtes séquences d'environ 20 bases qui s'apparient spécifiquement aux séquences complémentaires de l'ADN ou ARN simple-brin que l'on souhaite amplifier.
- Identification des acides nucléiques (par séquençage, hybridation des cibles sur une puce à ADN, par migration sur un gel d'électrophorèse, par marquage fluorescent, ou par spectroscopie de masse) et comparaison avec ceux déposés dans des banques de données.

Une des stratégies consiste à utiliser une séquence présente chez tous les micro-organismes. La cible la plus fréquemment utilisée en bactériologie pour l'identification est l'ADN ribosomal 16S (ADNr 16S). La séquence nucléotidique de l'ADNr 16S présente des régions communes à toutes les bactéries, alors que d'autres régions sont spécifiques de certaines espèces. Cette technique permet une identification universelle et exhaustive. Cependant, elle reste très coûteuse et peu démocratisée, car elle nécessite un personnel qualifié, est difficilement automatisable et impose l'usage de locaux dédiés pour éviter les contaminations.

### **1.2.4 Identification par spectroscopies**

**La spectrométrie de masse** La spectrométrie de masse pour l'identification est maintenant en plein développement dans les laboratoires de microbiologie. Début 2015, au niveau mondial, on dénombre environ 1000 installations dans le secteur clinique et pharmaceutique et une centaine dans le secteur alimentaire. [15][16] Le MALDI-TOF MS (*Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry*) est la technologie la plus courante. Les protéines bactériennes sont désorbées et ionisées par un laser. Ces ions sont ensuite accélérés dans un champ électrique et séparés en fonction du temps qu'ils mettent pour atteindre le détecteur (temps de vol). Ce temps dépend du rapport masse/charge. Chaque espèce détectée va former un pic sur le spectre, qui est, par la suite, comparé à une base de données. Plusieurs appareils basés sur cette technologie sont commercialisés : Vitek-MS (bioMérieux), AccuPRO-ID (Accugenix) ou encore MALDI Biotyper (Bruker).



**Figure 1.6 : Principe du MALDI-TOF MS. L'impact d'un laser provoque la désorption thermique de protéines bactériennes. Sous l'effet d'un champ électrique, les ions sont accélérés suivant leur masse et leur charge. Puis, les ions sont séparés dans un tube sans champ électrique et frappent le détecteur avec un « temps de vol » caractéristique de leur masse et de leur charge.**

**La spectroscopie Raman** Cette technique présente un grand potentiel pour la microbiologie diagnostique, bien qu'elle soit encore aujourd'hui peu connue de la majorité des microbiologistes de terrain. La spectroscopie Raman consiste à envoyer une lumière monochromatique sur l'échantillon et à analyser les longueurs d'onde de la lumière diffusée inélastiquement. La variation de longueur d'onde est spécifique de certains modes de vibrations de liaisons covalentes. La position et les intensités des pics sont par conséquent caractéristiques de la composition du pathogène analysé. Encore une fois, les spectres obtenus sont comparés à une base de données établie préalablement, [17] comme en spectrométrie de masse.

La spectroscopie Raman présente plusieurs avantages :

- ✓ Il s'agit d'une méthode quasi-non destructive si l'objet visé est une colonie, ce qui permet d'utiliser l'échantillon pour d'autres tests.
- ✓ On peut focaliser la lumière incidente (laser d'excitation dans le visible) sur une très petite zone. Il a même été montré qu'une identification sur bactérie unique est possible, [18] ce qui permet de s'affranchir d'une étape de culture.
- ✓ Il est possible d'obtenir des informations avec une préparation d'échantillon minime, sans avoir besoin de réactifs de marquage.

Il reste cependant nécessaire d'extraire les microorganismes à analyser de leur environnement complexe pour éviter un éventuel signal de fluorescence de l'échantillon, et de les placer dans un milieu de composition chimique connue et invariable.

	Méthodes phénotypiques	Méthodes spectroscopiques	Méthodes génomiques
<b>Avantages</b>	-Bas coût -Automatisation des étapes de remplissage, incubation et lecture.	-Peu de consommables -Peu de déchets -Résultats quasi-immédiats -Protocole simple pour la préparation des échantillons, peu d'étapes.	-Diagnostic précis -Les bases de données sont en pleine expansion.
<b>Inconvénients</b>	-Nécessité d'une étape de culture, résultats en 18 à 24 heures.	-Coût élevé de l'appareil -Influence du milieu de croissance sur le résultat de l'analyse -La base de données doit être suffisamment grande pour discriminer correctement certaines bactéries très proches	-Coût élevé des installations et des analyses -Nécessité de personnel hautement qualifié -Très peu automatisable

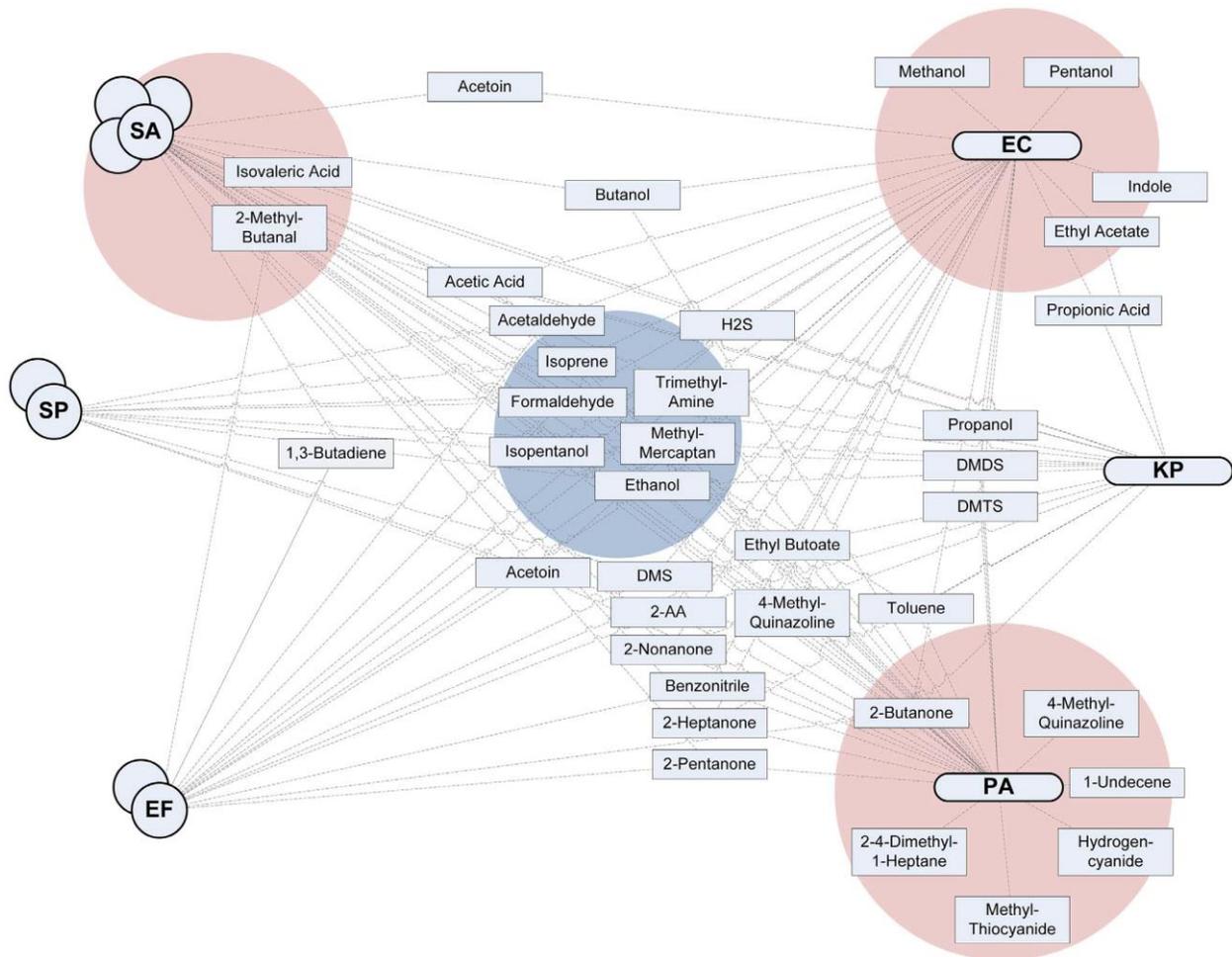
**Tableau 1.2 : Avantages et inconvénients des techniques pour l'identification de micro-organismes.**

L'approche suivie au cours de cette thèse s'inscrit dans le domaine des tests biochimiques basés sur le phénotype. Cependant, notre intérêt sera porté sur la fraction la plus volatile du métabolome.

## 2. Notre approche : les Composés Organiques Volatils Microbiens (mCOV)

### 2.1 L'analyse des composés volatils pour le diagnostic

Dès la Grèce ancienne, les médecins ont constaté qu'il est possible de détecter certaines maladies à l'odeur de fluides biologiques. Par exemple, l'analyse de l'air exhalé constitue un outil de choix pour le diagnostic de maladies pulmonaires. Certaines maladies comme le diabète entraînent la présence d'acétone dans l'haleine des patients. [19][20] Aujourd'hui, l'analyse des composés volatils pour le diagnostic est attrayante car elle constitue une alternative peu coûteuse et non-invasive. L'intérêt est grandissant pour le diagnostic de certaines maladies infectieuses ; en effet, il a été montré que certains micro-organismes génèrent de grandes quantités de composés volatils diversifiés et qu'il est possible de les distinguer par leur empreinte olfactive. Ces Composés Organiques Volatils Microbiens (MCOV) sont issus du métabolisme des micro-organismes. Il s'agit le plus souvent d'amines, de dérivés soufrés, d'acides carboxyliques, d'aldéhydes ou encore de cétones. [21][22] Les MCOV émis peuvent varier en fonction de facteurs extérieurs comme la température ou la composition du milieu. Certains composés volatils sont plus spécifiquement émis par quelques espèces seulement, alors que d'autres sont beaucoup plus universels (Figure 1.7). Toutefois il faut retenir que la spécificité à l'espèce n'est obtenue qu'en combinant la détection de plusieurs MCOV.



**Figure 1.7 : Composés volatils émis par six espèces de bactéries pathogènes : *Staphylococcus aureus* (SA), *Streptococcus pneumoniae* (SP), *Enterococcus faecalis* (EF), *Pseudomonas aeruginosa* (PA), *Klebsiella pneumoniae* (KP) et *Escherichia coli* (EC). Plus il y a de preuves de production d'un composé par un pathogène, plus il apparaît proche de celui-ci. Ainsi, quatre zones se démarquent : la zone en bleu correspond à des composés volatils émis par toutes les bactéries. Il s'agit donc de composés qui pourraient être utilisés pour des tests de stérilité. Les trois zones en rouge indiquent des métabolites produits uniquement ou très majoritairement par une espèce, il s'agit donc de possibles marqueurs d'infection à ces pathogènes. [21]**

Si le nez humain est un outil analytique très performant, à la fois sensible et capable de distinguer des centaines d'odorants différents, la sensibilité est variable en fonction des individus et chez un même individu à différentes périodes de sa vie. Depuis les années 70, différentes techniques ont été développées pour imiter le sens olfactif.

## 2.2 Les techniques d'analyse des composés volatils

### 2.2.1 La chromatographie en phase gazeuse

La chromatographie en phase gazeuse, le plus souvent couplée à une détection en spectrométrie de masse (GC-MS) ou ionisation de flamme (GC-FID) a été très utilisée pour la détermination et la quantification des MCOV. Les composés contenus dans l'espace de tête (*headspace*)

au-dessus d'une culture sont concentrés sur des adsorbants solides puis désorbés thermiquement dans l'injecteur du GC (*Solid-Phase Microextraction, SPME*).

Les métabolites volatils de micro-organismes d'intérêt comme *Aspergillus* ont été particulièrement étudiés, [23][24][25] ainsi que les COV produits par des bactéries pathogènes d'intérêt pour l'industrie agroalimentaire dans des échantillons de nourriture (*Salmonella typhimurium, Escherichia coli, Enterobacter aerogenes*). [26][27]

De manière similaire, les métabolites volatils produits par de faibles concentrations en pathogènes dans des hémocultures peuvent être analysés en spectrométrie de masse SIFT (Selected Ion Flow Tube). [28] Il s'agit une technique où les COV réagissent avec des ions (en général  $H_3O^+$ ,  $NO^+$ ,  $O_2^+$ ), les produits générés sont détectés en spectrométrie de masse. Si ces méthodes sont très sensibles pour détecter et identifier des composés volatils, elles restent relativement chères, du fait du coût de l'appareil et du besoin de personnel qualifié. Enfin, ces techniques, peuvent nécessiter une étape de pré concentration.

### **2.2.2 Les nez électroniques**

Les nez électroniques ont été décrits pour la première fois par Persaud et Dodd en 1981 puis Gardner et Bartlett les ont définis en 1994 : «An electronic nose is an instrument, which comprises an array of electronic chemical sensors with partial specificity and an appropriate pattern-recognition system, capable of recognising simple or complex odours ». [29][30] Ces systèmes sont particulièrement efficaces pour analyser des mélanges de COV. Chaque analyte peut interagir de manière non spécifique avec plusieurs détecteurs et chaque détecteur avec plusieurs analytes. La réponse multiparamétrique complexe obtenue dans le temps (cinétique sur chacun des capteurs) est comparée avec celles d'une banque de donnée pour des analytes seuls ou des mélanges. Seul des algorithmes d'apprentissage artificiel permettent alors de « reconnaître » une empreinte olfactive inconnue.

**Les nez à transduction électrique** Les détecteurs les plus communs sont ceux à base d'oxydes de métal semi-conducteurs (MOS) ou de polymères conducteurs.

Divers oxydes métalliques sont utilisés (étain, zinc, tungstène, titane) et parfois dopés avec d'autres métaux (palladium, platine, germanium) pour obtenir des réactivités variant en fonction des composés à détecter. L'adsorption de COV à la surface de ces matériaux et les éventuelles réactions redox avec l'oxygène provoquent une modification des charges en présence et un changement de la conductivité du métal. [31] Ces dispositifs sont souvent très sensibles (de l'ordre du ppb) mais fonctionnent à haute température (200-650°C).

Ce n'est pas le cas des capteurs à base de polymères organiques conducteurs qui fonctionnent à température ambiante. Les polymères utilisés sont des polyanilines, [32] ou encore des polypyrroles avec diverses fonctionnalisations. [33] Cependant, ces capteurs sont plus sensibles à l'humidité que les MOS et leurs durées de vie plus courtes.

Plusieurs systèmes, basés sur des technologies différentes, sont disponibles commercialement. La société Française AlphaMOS fait figure de leader avec plusieurs nez commerciaux contenant de 6 à

une trentaine de capteurs à base d'oxydes semi-conducteurs. [34] La société Vaporsens développe des nez électroniques avec des capteurs à base de polymères organiques conducteurs ciblant en particulier les composés présentant des propriétés rédox. [35]

**Les nez à transduction optique** Une transduction optique permet une lecture aisée, une instrumentation plus légère et moins onéreuse. Ainsi, des « nez colorimétriques » ont été développés : il s'agit de réseaux de capteurs colorimétriques non spécifiques. Les molécules utilisées sont des metallo-porphyrines, des sondes de pH, des sondes redox et des molécules solvatochromiques qui interagissent de manière non spécifique avec les COV *via* des échanges de protons ou électrons, des liaisons hydrogènes, des recouvrements  $\pi$ - $\pi$  ou encore des interactions dipôle-dipôle. Les changements de couleur de chaque capteur sont suivis à l'aide d'un simple scanner. En soustrayant l'image à  $t=0$  à celle obtenue après exposition aux COV un vecteur à 108 dimensions est obtenu : les intensités dans le bleu, le rouge et le vert pour chacun des 36 capteurs.

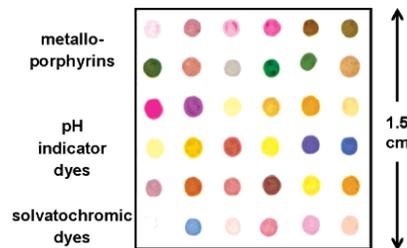


Figure 1.8 : Les nez à transduction optique : réseau de capteurs colorimétrique utilisé pour la discrimination de COV. [36]

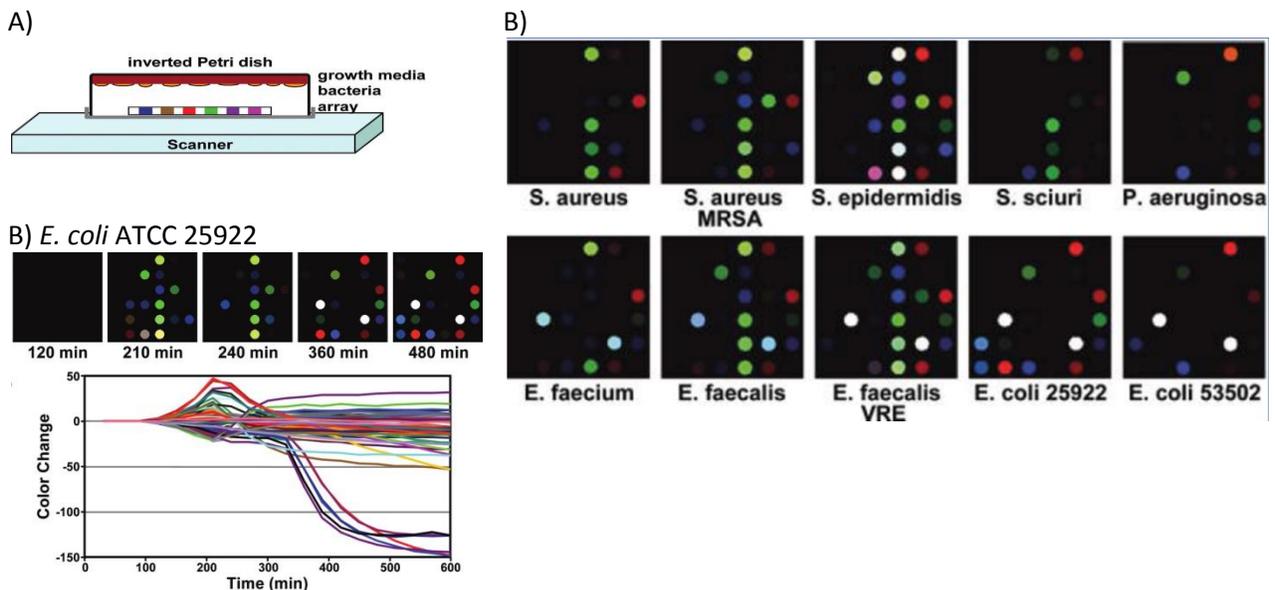


Figure 1.9 : Les nez à transduction optique, exemple d'application : la discrimination de bactéries. A) Dispositif de lecture lors de l'exposition aux cultures bactériennes. B) Images obtenues par soustraction de l'image du réseau avant est après différents temps d'exposition à *E. coli* et évolution au cours du temps des réponses de tous les capteurs (108 réponses car pour chaque capteurs sont relevés les canaux R, G et B). C) Réponses colorimétriques du réseau de capteurs pour une exposition à différentes souches de bactéries pendant 8 heures. Ces réponses sont obtenues en soustrayant les images du réseau avant et après l'exposition aux cultures bactériennes. [37]

Ces systèmes ont un coût très réduit et permettent de différencier plusieurs souches d'une même espèce de bactérie. [37][38] Des capteurs sont commercialisés par Specific Technologies pour la détection et l'identification de pathogènes dans des hémocultures.[39] Une seconde entreprise, Metabolomx, est spécialisée dans l'analyse de l'air expiré pour le diagnostic non invasif du cancer du poumon, la tuberculose et le cancer du côlon. [40]

L'élaboration d'une bibliothèque de données reste nécessaire pour analyser l'empreinte colorimétrique d'un mélange complexe de COV comme peut l'être l'espace de tête d'une culture bactérienne et pour prendre en compte les variations possibles dues au milieu de culture.

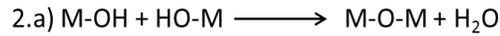
L'objectif de la thèse est la réalisation de capteurs à transduction optique spécifiques à certains COV cibles. Contrairement à la chromatographie en phase gazeuse qui nécessite une étape de préconcentration avant la détection, nous avons pour objectif de concentrer le COV et de révéler sa présence *in situ*, par absorbance ou fluorescence dans le matériau même où il est capturé (transduction optique *directe*). Celui-ci doit donc être à la fois poreux, avec une surface spécifique élevée, avoir une affinité pour le COV à capturer et permettre une transduction optique dans le visible (non diffusant, non absorbant et/ou non fluorescent).

### 3. Détection optique de COV dans des xérogels

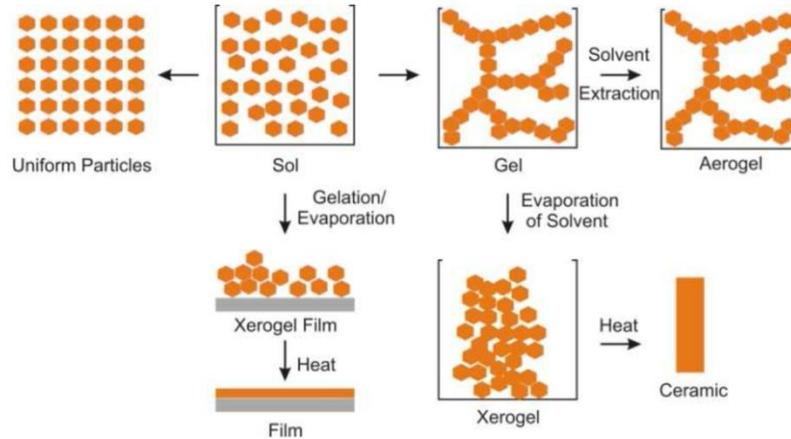
#### 3.1 Formation d'un réseau d'oxyde poreux par chimie sol-gel

Dans le cadre d'une transduction optique directe, nous chercherons à accumuler le COV dans une matrice poreuse et à révéler sa présence en absorbance ou en fluorescence. Si le COV ne présente pas intrinsèquement les propriétés optiques requises, l'ajout d'une sonde sera nécessaire. Une sonde est une molécule présente dans la matrice qui, après réaction avec le COV, forme un composé fluorescent ou coloré aisé à détecter par transduction optique. Les matrices poreuses préparées par voie sol-gel répondent au cahier des charges d'une transduction optique directe: elles développent une grande surface spécifique ( $m^2$  de surface accessible au gaz par unité de masse du matériau), leur porosité est ajustable suivant le protocole de synthèse. [41] Enfin, elles peuvent être transparentes dans le visible, et ne présentent que peu de fluorescence intrinsèque.

Le terme sol-gel correspond à l'abréviation « solution-gélification ». La synthèse d'un sol par voie organique se fait par ajout d'eau à une solution contenant des alcoxydes  $M(OR)_n$  où M sera le Silicium, le Zirconium ou le Titane. Après l'ajout d'eau, une suspension colloïdale de particules d'oxyde se forme, le sol, par le biais de réactions d'hydrolyse et de condensation. Ce sol évolue en un réseau tridimensionnel et forme un gel.

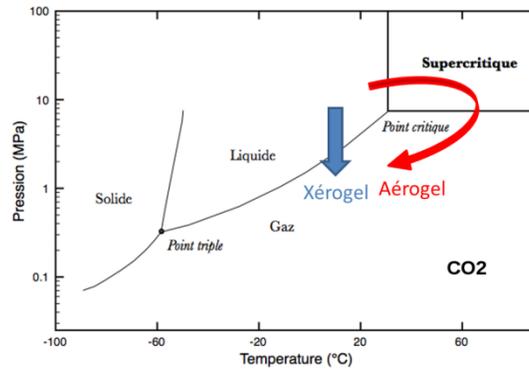


**Figure 1.10 : Principe de la polymérisation par voie sol-gel. 1) Réaction d'hydrolyse des alcoxydes et formation d'hydroxydes, 2) réactions de condensation avec formation de ponts oxo, 2a) réaction d'oxolation, 2b) réaction d'alcoxylation**



**Figure 1.11 : Etapes d'une synthèse sol-gel. [42]**

Le sol peut être mis en forme de film, par *spin-coating* ou *dip-coating* par exemple, ou être moulé afin d'obtenir des pièces monolithiques. Un séchage contrôlé permet d'obtenir un solide poreux. Des aérogels sont obtenus après un séchage super critique qui consiste à remplacer l'alcool et l'eau formés au cours des réactions d'hydrolyse et de condensation par un fluide supercritique. En abaissant la pression, le fluide supercritique devient gaz. Ce type de séchage a l'avantage d'éviter la tension de surface à l'interface liquide/gaz qui peut endommager la structure solide lorsque le solvant interstitiel s'évapore. Le gel sec obtenu par séchage « naturel », c'est-à-dire par évaporation des solvants, est appelé un xérogel. Au cours du vieillissement des gels, les groupements hydroxyles résiduels condensent entre eux; cette réticulation s'accompagne d'une contraction du réseau solide.



**Figure 1.12 : Les différents modes de séchage des gels. Le séchage supercritique (flèche rouge) va au-delà du point critique du fluide considéré (ici le CO<sub>2</sub>) pour éviter la transition directe liquide-gaz d'un séchage ordinaire (flèche bleue).**

## 3.2 Des matériaux préparés par voie sol-gel pour la détection optique de composés organiques volatils

Plusieurs articles recensent l'utilisation de matériaux poreux préparés par voie sol-gel pour la détection optique de COV à l'aide d'une molécule sonde. La réaction sonde-cible doit satisfaire aux contraintes suivantes :

- La molécule sonde doit être stable dans le gel puis dans le xérogel.
- La réaction sonde-cible doit être la plus spécifique possible de la molécule ciblée.
- La réaction sonde-cible doit être rapide et quantitative.
- Pour une détection en absorbance, si la molécule sonde est elle-même absorbante, elle doit absorber à une longueur d'onde suffisamment éloignée de celle à laquelle absorbe le produit de la réaction.
- Pour une détection en fluorescence, le produit doit émettre à une longueur d'onde suffisamment éloignée de l'absorbance éventuelle de la molécule sonde et de la matrice xérogel.

### 3.2.1 Détection par luminescence

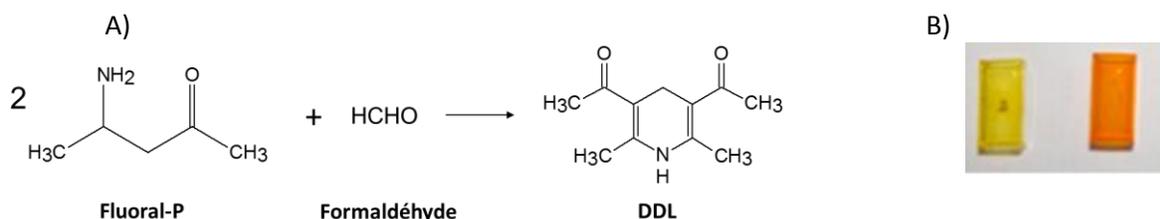
Des xérogels de silice luminescents ont été développés pour détecter l'acide nicotinique, un métabolite très spécifique de *Mycobacterium tuberculosis*. Un complexe de nitrate de terbium (III) a été choisi comme molécule-sonde car la luminescence du terbium (III) peut être exaltée en présence de certains ligands organiques, notamment l'acide nicotinique. [43]

Il a été montré que l'oxygène peut être détecté par extinction de fluorescence d'une molécule sonde fluorescente dans un aérogel de silice. La molécule sonde fluorescente utilisée dans ce cas est le N-(3-triméthoxysilylpropyl)-2,7-diazapyrénium bromide (DAP). [44]

### 3.2.2 Détection par absorbance

Des porphyrines, comme la Méso-tétra (4-carboxyphényl) porphine (CTPP), ont été utilisées comme molécules sonde dans des silices mésoporeuses pour la détection colorimétrique de toluène, cyclohexane et éthanol. [45]

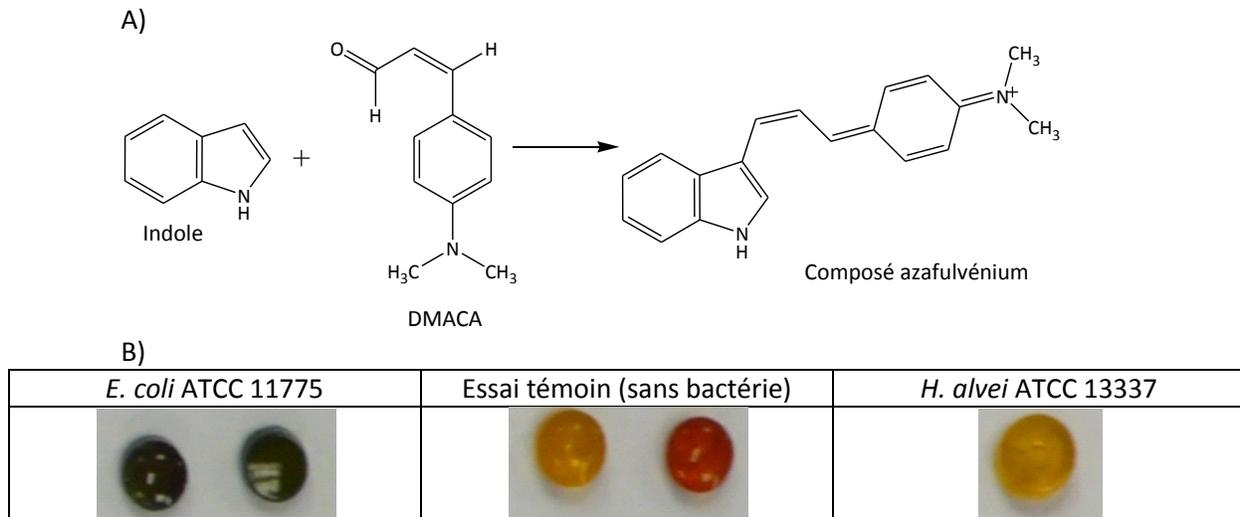
Des xérogels de silice sont également utilisés pour la détection de polluants de l'air intérieur. C'est le cas du formaldéhyde, présent dans bon nombre de colles, peintures ou vernis, et qui est aussi produit par certains champignons [46] et micro-organismes marins. [47], [48] Des xérogels contenant une molécule sonde, le Fluoral-P, permettent de détecter le formaldéhyde en absorbance par formation de 3,5-diacétyl-1,4-dihydrolutidine (DDL). Le pic maximal d'absorption de la DDL se situe autour de  $\lambda_{\max} = 410$  nm. [49], [50], [51] La matrice poreuse passe alors du jaune à l'orange (Figure 1.13). Ces capteurs colorimétriques sont commercialisés par la société Ethern avec un kit de lecture optique. [52] La DDL peut aussi être détectée en fluorescence ( $\lambda_{\text{ém}} = 512$  nm, [50][53]). La réponse à l'exposition en phase gazeuse est obtenue en 3 minutes sur une gamme de détection allant de 0 à  $30 \pm 5$  ppb.



**Figure 1.13 : Principe des capteurs colorimétriques pour le formaldéhyde. A) Réaction entre le Fluoral-P et le formaldéhyde, B) le monolithe dopé au Fluoral-P, incolore au départ, devient, au fur et à mesure de l'exposition au formaldéhyde, jaune puis orange . [49]**

De même, le benzène et le xylène ont été détectés dans des xérogels sans molécule sonde par absorption dans l'UV entre 250 et 300 nm. Les limites de détection sont de 20 ppb pour le benzène et 40 ppb pour le xylène. [54] Une autre approche consiste à capter le benzène dans les mésopores de billes de silices formant un cristal photonique. L'adsorption du benzène provoque un changement d'indice de réfraction et un déplacement du pic dans le spectre de réflexion. [55]

Enfin, Crunaire *et al.* ont également suivi cette démarche pour la détection d'indole. Ce composé est formé par les bactéries capables de dégrader le tryptophane. Le para-diméthylaminocinnamaldéhyde (DMACA) a été choisi comme molécule sonde, il réagit avec l'indole pour donner un sel d'azafulvénium de couleur bleu-vert. Ce produit absorbe à 624 nm et possède un coefficient d'extinction molaire très élevé ( $\epsilon_{624\text{nm}} = 97\,000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). [56], [57] Des xérogels dopés avec du DMACA ont été exposés à la phase gazeuse de cultures de bactéries sur milieu gélosé enrichi au tryptophane afin de discriminer les bactéries produisant de l'indole des autres. En présence d'indole, les capteurs deviennent vert foncé tandis qu'en l'absence d'indole, ils restent orange (Figure 1.14). La sensibilité est telle que l'indole est détecté au bout de 7 heures, avant même que les colonies de bactéries ne soient visibles à l'œil nu.



**Figure 1.14 : Principe des capteurs colorimétriques pour l'indole. A) Réaction de formation d'un sel d'azafulvénium lors de la réaction sélective du *para*-diméthylaminocinnamaldéhyde (DMACA) sur l'indole, B) Photographies de xérogels dopés DMACA exposés à différentes souches de bactéries. Au bout de 24 heures *E. coli* forme de l'indole, conférant au xérogel une couleur vert foncé. En absence d'indole, le xérogel est orange ; enfin *H. alvei* ne forme pas d'indole et le xérogel est orange. [56]**

Dans la fraction volatile du métabolome, on trouve principalement des composés organiques volatils tels que des amines, des esters, des aldéhydes, des cétones, *etc.* [21] Par abus de langage, le sulfure d'hydrogène, et le dioxyde de carbone sont parfois aussi appelés COV. Ces composés volatils sont dit « endogènes », c'est-à-dire qu'ils sont naturellement produits par des bactéries sauvages (*i.e.* non génétiquement modifiées) dans des conditions classiques de culture. Parmi ces composés volatils, les sulfures sont des métabolites classiques. En particulier, le sulfure d'hydrogène présente un intérêt majeur car il est produit par *Salmonella*, une bactérie responsable de nombreuses infections alimentaires. De même, l'indole est un métabolite intéressant car spécifique d'*E. coli*. [56]

Pour chaque nouveau COV endogène à détecter, il est nécessaire de rechercher une nouvelle molécule sonde spécifique, étudier la réaction sonde-cible et développer les matériaux poreux qui serviront de capteurs. Il peut être très difficile de trouver une molécule sonde spécifique pour de petites molécules peu réactives comme le méthane, l'éthanol ou l'ammoniac qui sont pourtant des COV présents chez un grand nombre de pathogènes d'intérêt. [21]

Une nouvelle stratégie consiste alors, non plus à rechercher un COV spécifique à une bactérie donnée, mais de lui faire produire un COV que l'on sait détecter. Cela est possible en utilisant un substrat enzymatique pouvant libérer un composé volatil sous l'action d'une enzyme spécifique de la bactérie ciblée. [58] [59]

## 4. Les substrats enzymatiques

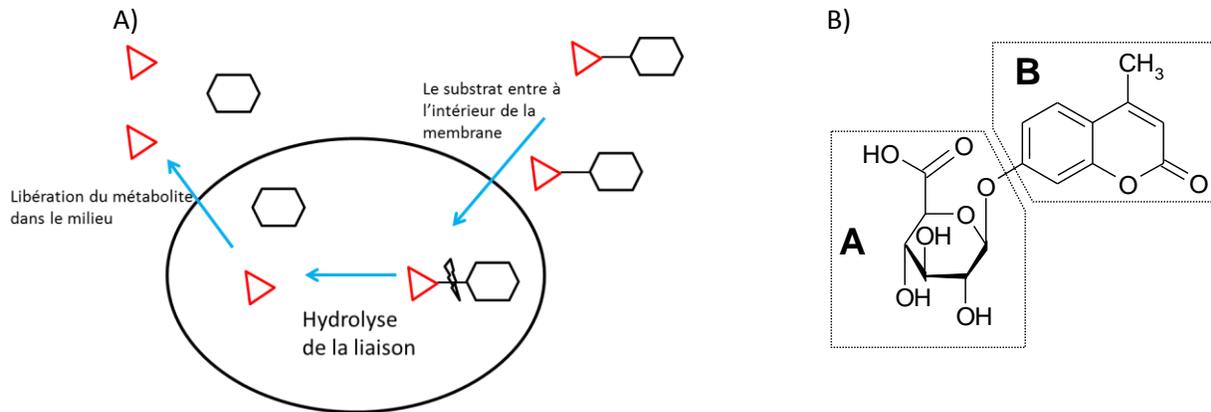
### 4.1 Généralités

Les substrats enzymatiques sont des outils de base en microbiologie ; ils sont largement utilisés pour étudier des voies enzymatiques et détecter des microorganismes. Un substrat enzymatique A-B est composé de deux molécules reliées entre elles par une liaison chimique bien particulière qui sera la cible de l'action enzymatique étudiée (une hydrolyse la plupart du temps). La molécule A est un composé organique tel qu'un sucre, un acide gras, un acide phosphorique ou encore un acide aminé. Cette molécule organique est liée à une molécule B bien choisie qui sera libérée dans le milieu et détectée une fois la liaison clivée par l'action enzymatique.

Plusieurs conditions sont requises pour avoir un substrat enzymatique : l'assemblage covalent A-B doit être reconnu par l'enzyme ciblée, et le substrat doit être hydrosoluble et doit pouvoir traverser la membrane plasmique des microorganismes pour y entrer.

Les substrats enzymatiques peuvent être classés en fonction de la détection employée pour détecter le produit B issu de la dégradation enzymatique. [60]

- **Les substrats chromogènes** libèrent dans le milieu un composé coloré qui sera détecté en absorbance. Parmi les substrats chromogènes, on distingue les substrats chromogènes précipitants, utilisés en milieu de culture solide (milieux gélosés). Le substrat enzymatique est hydrosoluble et passe à l'intérieur du microorganisme où il sera clivé. Le métabolite libéré, souvent un composé indoxyl, s'oxyde à l'air et forme un colorant de la famille de l'indigo. Fortement insoluble dans l'eau, il précipite à l'intérieur du microorganisme.
- **Les substrats fluorogènes** utilisent une molécule fluorescente dont la fluorescence est inhibée lorsqu'elle est dans le substrat. Après clivage de la liaison, le métabolite fluorescent est libéré.
- **Les substrats luminogènes**, plus rares, libèrent un composé luminescent, c'est-à-dire que le composé est libéré dans un état excité et se désexcite en émettant un photon. La luminescence permet une détection avec une très grande sensibilité : comme il n'y a pas de lumière d'excitation, il n'y a pas de « bruit de fond » au signal mesuré (pas de fluorescence ou d'absorbance intrinsèque). [60], [61] De plus, l'instrumentation nécessaire est très simple, un capteur CMOS suffit.



**Figure 1.15 : Principe des substrats enzymatiques. A) Hydrolyse du substrat enzymatique à l'intérieur de la cellule, l'hexagone représente la molécule A qui constitue la cible de l'enzyme, le triangle représente la molécule B qui sera détectée. B) Exemple de substrat enzymatique : la molécule A est un sucre qui cible l'enzyme  $\beta$ -D-glucuronidase, la molécule B est un fluorophore, le 4-méthylumbellifère. Tant que B est lié à A, la fluorescence de B est inhibée.**

La plupart des substrats enzymatiques utilisés en microbiologie ciblent des hydrolases. En particulier, les glycosidases qui catalysent l'hydrolyse de liaisons glycosidiques et libèrent au moins un composé osidique, les estérases qui catalysent l'hydrolyse d'une liaison ester, et enfin les phosphatases. Pour ces activités, le composé libéré, qui sera détecté, doit contenir une fonction alcool. Parmi les hydrolases, on compte aussi les peptidases qui catalysent l'hydrolyse d'une liaison peptidique et libèrent un acide aminé. Dans ce cas, le composé libéré doit contenir une fonction amine.

Activité enzymatique	Exemple de substrat enzymatique	Composé libéré	Type de détection optique
$\beta$ -D-glucuronidase ( <i>E. coli</i> )		Indigo 	Colorimétrique (formation d'un précipité bleu-noir)
		4-méthylumbellifère 	Fluorescence ( $\lambda_{\text{ex}} = 372 \text{ nm}$ , $\lambda_{\text{em}} = 445 \text{ nm}$ )
$C_8$ -estérase ( <i>Salmonella</i> )		4-nitrophénol 	Absorbance ( $\lambda_{\text{max}} = 401 \text{ nm}$ )

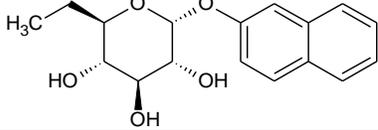
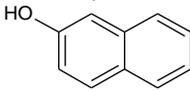
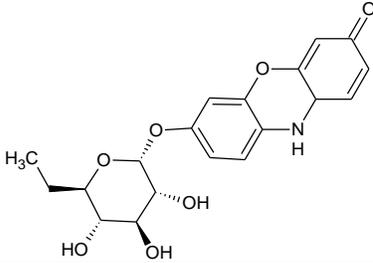
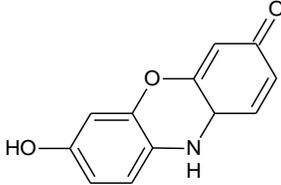
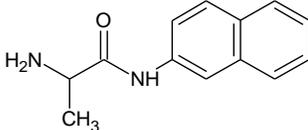
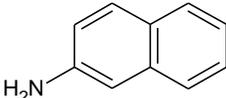
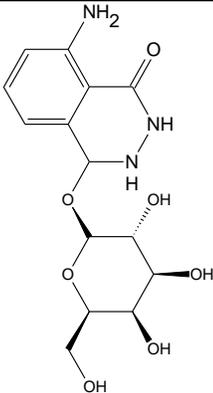
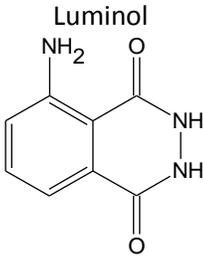
$\alpha$ -glucosidase ( <i>S. aureus</i> )		2-naphthol 	Fluorescence ( $\lambda_{\text{ex}} = 320 \text{ nm}$ , $\lambda_{\text{em}} = 410 \text{ nm}$ )
		Résorufine 	Absorbance ( $\lambda_{\text{max}} = 570 \text{ nm}$ ) Fluorescence ( $\lambda_{\text{ex}} = 570 \text{ nm}$ , $\lambda_{\text{em}} = 585 \text{ nm}$ )
L-alanine arylamidase (GRAM-)		$\beta$ -naphthylamine 	Absorbance (sonde DMACA, $\lambda_{\text{max}} = 540 \text{ nm}$ ) Fluorescence ( $\lambda_{\text{ex}} = 340 \text{ nm}$ , $\lambda_{\text{em}} = 403 \text{ nm}$ )
$\beta$ -D-galactosidase		Luminol 	Luminescence

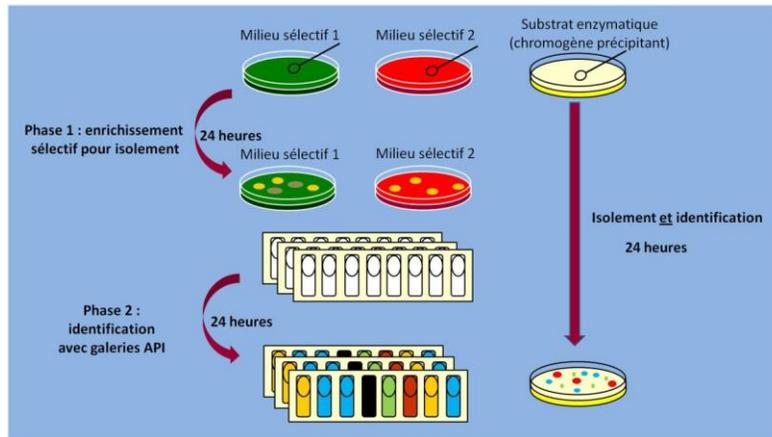
Tableau 1.3 : Exemples de substrats enzymatiques chromogènes, chromogènes précipitants, fluorogènes et luminogènes.

## 4.2 Utilisation de substrats enzymatiques pour l'identification de micro-organismes

Du fait de la spécificité de certaines voies enzymatiques, les substrats enzymatiques sont un outil très utilisé pour l'identification de micro-organismes. Depuis les années 1990, une large gamme de substrats est disponible commercialement. Ces substrats sont généralement couplés entre eux et/ou avec un antibiotique dans un milieu de culture pour faciliter la différenciation et l'identification des espèces dans un échantillon qui peut être polymicrobien. Les substrats chromogènes précipitants sont particulièrement utilisés dans les milieux de cultures gélosés commerciaux.

Dans les méthodes traditionnelles, différents milieux d'enrichissement sélectifs sont inoculés avec l'échantillon (Phase 1, 24 heures). Ensuite, afin de déterminer la souche de bactérie, les colonies isolées sont soumises à des tests d'identification biochimique (type galerie API) (Phase 2, 24 heures). Ces méthodes traditionnelles nécessitent l'utilisation de beaucoup de consommables (milieux sélectifs, tests d'identification) et deux étapes pour un total de 48 heures.

Comparativement, l'utilisation de substrats enzymatiques dans les milieux de culture apporte un gain de coût (moins de consommables) et de temps. Les deux phases d'isolement et d'identification sont rassemblées en une seule étape de 24 heures.



**Figure 1.16 : Isolement et identification de micro-organismes par les méthodes traditionnelles et par l'utilisation de milieux contenant des substrats enzymatiques, ici chromogènes précipitants. [62]**

La Figure 1.17 donne trois exemples de milieux commerciaux utilisant des substrats chromogènes précipitants pour l'identification de pathogènes :

- BBL CHROMagar, commercialisé par Becton Dickinson pour la mise en évidence de *Salmonella*. Ce milieu contient un substrat C<sub>8</sub>-esterase, activité enzymatique très peu présente chez les autres *Enterobacteriaceae*. D'autres espèces capables de cliver un tel substrat (par exemple des levures ou *Pseudomonas*) peuvent être inhibées par l'incorporation d'agents sélectifs comme La céfsulodine (antibiotique contre *Pseudomonas*) ou l'amphotéricine (antifongique). [63]
- ChromID MRSA, commercialisé par bioMérieux contient un substrat  $\alpha$ -glucosidase libérant un composé indoxyl bleu-vert qui précipite dans les bactéries. [64] Afin de cibler particulièrement les *Staphylococcus aureus* résistants à la méthiciline (MRSA), un antibiotique, la céfoxitine est ajouté. [65], [66]
- Brilliance *E. coli*/coliformes, commercialisé par Oxoid, contient deux substrats enzymatiques. Le premier, un substrat précipitant  $\beta$ -galactosidase, cible les coliformes et colore les colonies positives en rose. Le second cible l'activité  $\beta$ -glucuronidase et colore les colonies en bleu. *E. coli* est capable de produire les enzymes capables d'hydrolyser chacun des deux substrats, les colonies de cette espèce seront colorées en violet (mélange rose + bleu). Le milieu contient aussi du laurylsulfate de sodium (SDS), un inhibiteur de Gram+. [67]

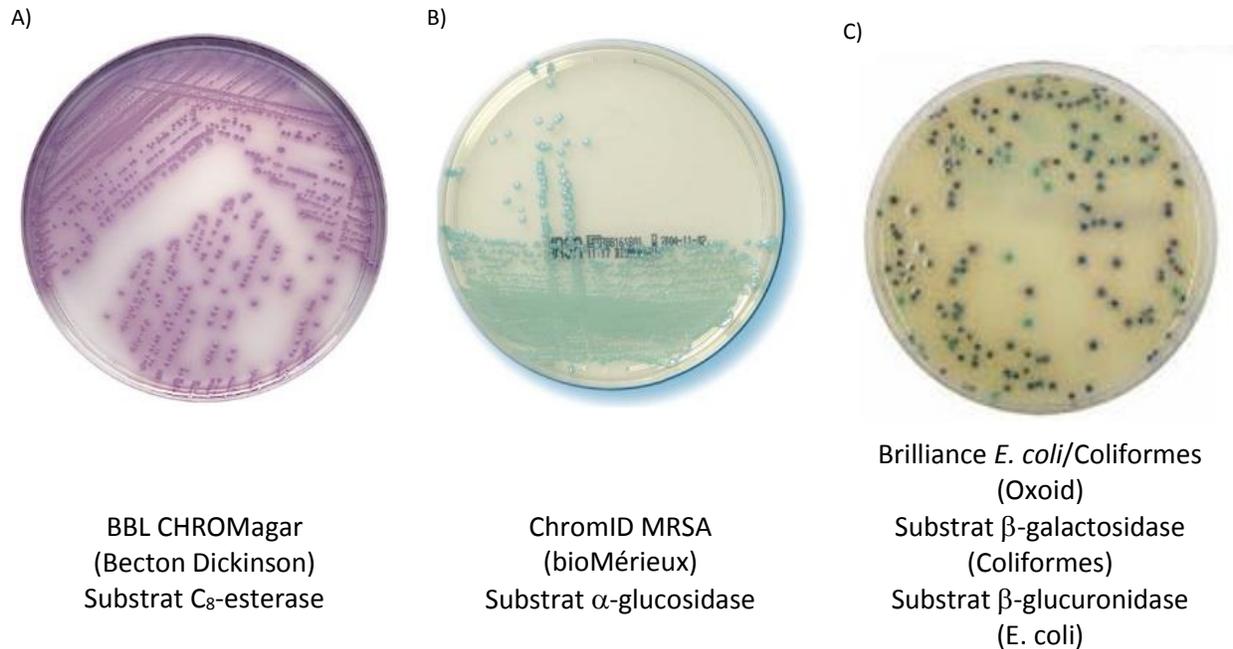


Figure 1.17 : Exemples de milieux chromogènes commerciaux pour l'identification de pathogènes.

### 4.3 La régulation de la production d'enzymes

La quantité d'enzymes synthétisée par un micro-organisme peut varier énormément en fonction de plusieurs facteurs environnementaux tels que la température, le pH, la composition du milieu et la phase de croissance. [68] Les enzymes sont synthétisées par transcription de l'ADN en ARN messenger puis traduction de ce dernier en une chaîne d'acides aminés. Les gènes impliqués dans un processus métabolique sont souvent groupés sur le chromosome et organisés en unité de transcription appelée opéron. Des protéines régulatrices contrôlent l'expression de ces gènes. En se liant à l'ADN au niveau de séquences spécifiques, elles régulent le taux de transcription. Certains mécanismes sont détaillés en Annexe 8. Ainsi, il est important de savoir que certaines molécules peuvent induire une activité enzymatique alors que d'autres, au contraire, peuvent l'inhiber.

Les prélèvements à tester sont dilués dans un milieu de culture contenant le substrat enzymatique et des nutriments. Si des bactéries sont présentes dans le milieu, elles vont se multiplier en consommant les nutriments et le substrat enzymatique. La détection du métabolite se fait généralement directement dans le milieu. C'est le cas dans le système de dénombrement d'*E. coli* (TEMPO EC, bioMérieux) qui utilise le substrat 4-méthylumbellifère -β-D-glucuronide pour la mise en évidence de l'activité β-glucuronidase. Le 4-méthylumbellifère libéré est détecté directement dans le milieu de culture en fluorescence. [69]

## 5. Les substrats enzymatiques osmogènes

### 5.1 Interêt

Dans de nombreuses applications, la détection des métabolites dans le milieu même est difficile ou impossible car les matrices sont intrinsèquement absorbantes (c'est-à-dire fortement colorées), fluorescentes, ou encore diffusantes. C'est le cas par exemple de certains échantillons cliniques (sang, urine, exsudat etc.) ou encore les matrices alimentaires. Pour s'affranchir de ces contraintes, il est possible de capturer le métabolite issu de la dégradation enzymatique dans une autre phase que le milieu de culture, en l'occurrence la phase gazeuse située au-dessus de la culture.

Nous définissons un **substrat osmogène** (du grec *osme* : odeur) comme un substrat enzymatique libérant un **métabolite volatil** aisé à détecter en phase gaz. La dégradation d'un substrat osmogène entraîne la libération d'un **Composé Organique Volatil exogène** ; il s'agit d'un composé volatil qui n'est pas produit par une bactérie sauvage dans des conditions classiques de culture. Cela signifie qu'un tel composé volatil est absent des métabolites émis par une bactérie dans la majorité des milieux de culture. [58]

Un COV exogène doit répondre à plusieurs exigences :

- Le COV exogène doit être facile à coupler via une liaison covalente à une autre molécule organique (sucre, acide carboxylique, alcool, amine, acide aminé) afin de former un substrat enzymatique. Nous nous intéresserons particulièrement aux molécules porteuses de groupement hydroxyles (-OH) qui pourront former des substrats osmogènes visant les activités estérase, glycosidase, phosphatase et aux molécules porteuses d'amines (-NH<sub>2</sub>) qui pourront former des substrats pour les peptidases.
- Le COV exogène doit être hydrosoluble et avoir une constante de Henry élevée, ceci afin que la concentration en COV dans la phase gazeuse soit la plus élevée possible.
- Enfin, ce COV exogène doit être facilement détectable. Dans le cadre d'une détection optique, cette molécule devra posséder des propriétés d'absorbance, de fluorescence ou de luminescence.

### 5.2 Utilisation de substrats osmogènes pour le diagnostic

#### 5.2.1 *Substrats osmogènes pour l'hémoculture*

Apparu dans les années 70, le Bactec 460 a été le premier automate d'hémoculture. Il était basé sur la détection d'une forme radioactive du CO<sub>2</sub>, métabolite gazeux émis par tous les pathogènes. Dans ce système, le sang était incubé dans un milieu nutritif contenant plusieurs substrats marqués <sup>14</sup>C (notamment du glucose, et des acides aminés). Ainsi, une partie du CO<sub>2</sub> émis par les micro-organismes était marqué <sup>14</sup>C et quantifié en phase gaz par émission  $\beta$  à 156 keV. [70]

### 5.2.2 Substrats osmogènes pour détecter l'activité uréase d'*Helicobacter pylori*

Un autre isotope du carbone, le  $^{13}\text{C}$ , est utilisé pour la détection d'*Helicobacter pylori*, une bactérie qui, présente dans l'estomac, peut provoquer des ulcères et cancers. Afin d'éviter une biopsie invasive, un test respiratoire est disponible. Il s'agit d'une pastille d'urée marquée au  $^{13}\text{C}$  avalée par le patient. *H. pylori* se caractérise par sa production importante d'enzymes uréases. En présence de cette bactérie dans l'estomac, l'urée est dégradée en ammoniac et  $^{13}\text{CO}_2$  détecté dans l'air expiré.

Suslick *et al.* ont aussi utilisé l'urée comme substrat pour les enzymes uréases de *H. pylori*. Cependant, l'urée n'est pas marquée par un isotope du carbone car c'est l'ammoniac libéré qui est recherché dans l'air expiré par les patients. Il est mis en évidence grâce à un réseau de capteurs colorimétriques comme celui présenté au paragraphe 2.2. [71]

### 5.2.3 Substrats osmogènes pour la détection d'activités enzymatiques glycosidases

En 1991, Snyder montre qu'il est possible de détecter en phase gazeuse un métabolite exogène d'*Escherichia coli*. Il s'agit du 2-nitrophénol (ou *o*-nitrophénol) libéré par l'hydrolyse du substrat 2-nitrophényl- $\beta$ -D-galactopyranoside par les enzymes galactosidases d'*E. coli*. Le 2-nitrophénol libéré est mis en évidence dans l'espace de tête de la culture bactérienne par spectrométrie de mobilité ionique (IMS : *Ion Mobility Spectrometry*). Il s'agit de soumettre des molécules ionisées à un champ électrique dans un gaz vecteur. Les ions se déplacent suivant le champ électrique à une vitesse qui dépend de leur masse, de leur taille et de leur interaction avec le gaz vecteur. En arrivant sur l'électrode, chaque espèce chimique génère un signal spécifique. On mesure alors le courant ionique en fonction de l'instant d'arrivée.

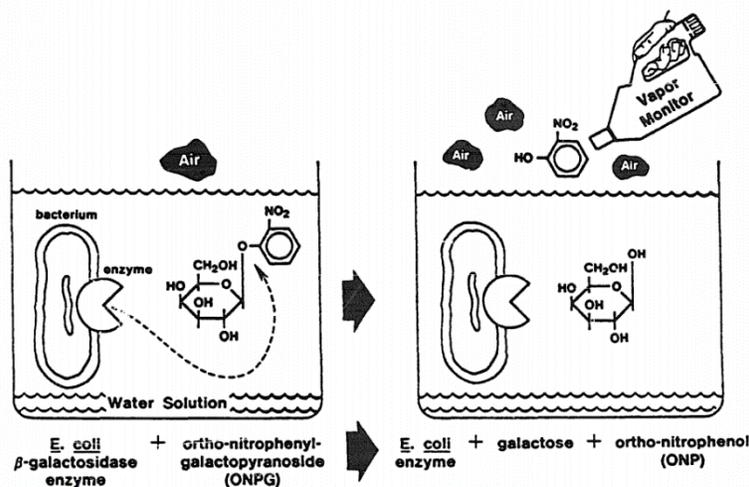


Figure 1.18 : Principe de la détection d'*E.coli* via son activité enzymatique  $\beta$ -galactosidase. Le 2-nitrophénol libéré est détecté par spectrométrie de mobilité ionique. [72]

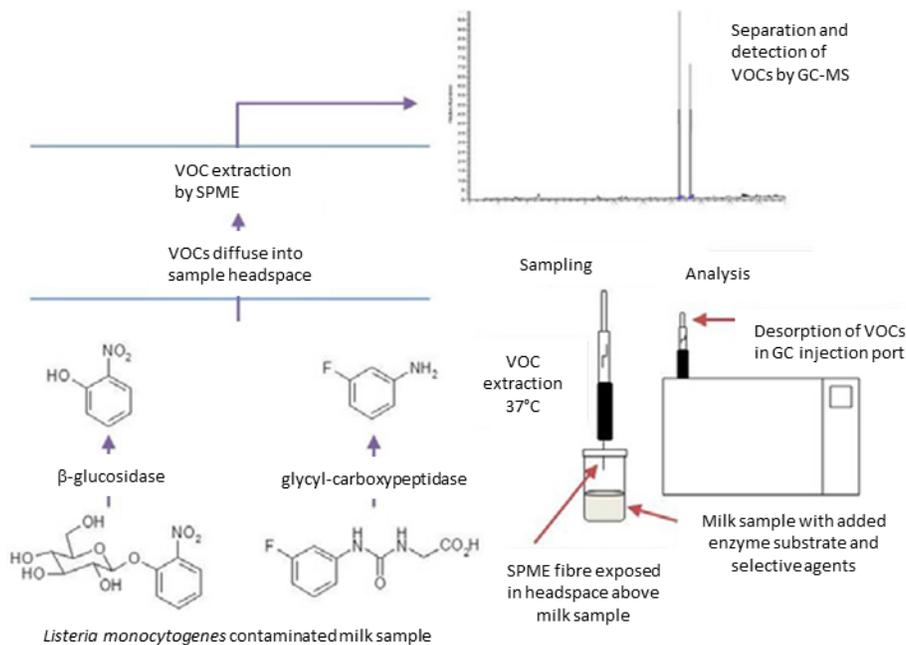
Des substrats libérant du 2-nitrophénol ont aussi été exploités par Strachan *et al.* pour la détection de pathogènes dans les aliments. Dans ce cas, une détection en phase gazeuse prend tout son intérêt puisque des échantillons alimentaires broyés dans un milieu nutritif constituent des matrices diffusantes et souvent colorées dans lesquelles une détection dans la phase liquide est quasi-impossible.

Un substrat 2-nitrophényl-β-D-galactopyranoside a été utilisé pour la détection de coliformes et un substrat 2-nitrophényl-β-D-glucuronide pour cibler plus spécifiquement *E. coli*. Dans les deux cas, l'IMS était utilisée pour révéler la présence de 2-nitrophénol. [73][74] Cette étude a révélé que certaines matrices alimentaires, en particulier les viandes crues, présentent une activité β-glucuronidase intrinsèque. Pour ces matrices, il y a donc un « bruit de fond » correspondant au 2-nitrophénol libéré par cette activité intrinsèque.

Enfin, plus récemment, deux voies enzymatiques ont été ciblées pour la détection de *Listeria monocytogenes* dans des échantillons de lait :

- La voie enzymatique β-glucosidase avec un substrat 2-nitrophényl-β-D-glucoside libérant du 2-nitrophénol
- La voie enzymatique hippuricase avec comme substrat l'acide 2-[(3-fluorophényl)carbamoylamino] acétique libérant la 3-fluoroaniline.

Le 2-nitrophénol et la 3-fluoroaniline ont des constantes de Henry élevée, respectivement  $5,85 \cdot 10^{-4}$  et  $9,08 \cdot 10^{-5}$ . Ils sont d'abord concentrés sur une phase solide, puis thermo-désorbés dans l'injecteur avant d'être analysés par chromatographie en phase gazeuse couplée à une spectroscopie de masse. La limite de détection atteinte pour le 2-nitrophénol est de  $17 \mu\text{g/mL}$  soit  $12,2 \mu\text{mol/L}$  dans la phase liquide. [75]



**Figure 1.19 : Principe de la détection de deux COV exogènes en SPME-GC-MS : le 2-nitrophénol et la 3-fluoroaniline, libérés respectivement par des substrats visant les activités enzymatiques β-glucosidase et hippuricase, par micro-extraction sur phase solide puis analyse en chromatographie en phase gazeuse. [75]**

Afin de simplifier l'instrumentation liée à la mise en évidence des COV exogènes, les mêmes auteurs se sont tournés tout récemment vers une détection par absorbance du 2-nitrophénol après piégeage dans un gel d'agarose. [76]

## 6. Présentation du sujet de thèse

La thèse s'intéresse aux Composés Organiques Volatils Microbiens (MCOV) pour la détection et l'éventuelle identification de bactéries pathogènes. Deux stratégies seront exploitées : la détection de métabolites endogènes spécifiques d'espèces pathogènes d'intérêt et la détection de métabolites exogènes issus d'une activité enzymatique spécifique. L'approche suivie sera la même que Paolacci *et al.* [50], et Crunaire *et al.* [56], à savoir le piégeage, la concentration et la détection des MCOV dans une matrice solide poreuse transparente à grande surface spécifique.

### 6.1 Choix des MCOV

Les Salmonelles produisent de grandes quantités de sulfure d'hydrogène. Il sera donc choisi comme premier COV à détecter.

Nous nous intéresserons aussi à deux COV exogènes. Le premier contient une fonction alcool, le 2-nitrophénol, qui permettra de cibler des activités enzymatiques estérases, glycosidases et phosphatases. Par exemple, l'activité C<sub>8</sub>-estérase (hydrolyse d'un ester contenant une chaîne octanoate), est spécifique de *Salmonella*. Elle permettra de différencier *Salmonella* d'autres bactéries productrices de sulfure d'hydrogène comme *Clostridium* spp. [77] Ce même COV servira aussi à la détection d'autres activités enzymatiques spécifiques d'intérêt : la  $\beta$ -glucuronidase spécifique d'*E. coli* et l'activité  $\alpha$ -glucosidase de *S. aureus*.

Le second COV exogène, portant une fonction amine, la  $\beta$ -naphthylamine, ciblera une activité peptidase. Nous nous intéresserons particulièrement à l'activité L-alanine aminopeptidase qui présenterait l'avantage d'être hydrolysé uniquement par les bactéries Gram-. [78]

Ces deux composés sont choisis pour leurs propriétés optiques (absorbance dans le visible pour le 2-nitrophénol et fluorescence pour la  $\beta$ -naphthylamine), physicochimiques (constante de Henry élevée, pKa) et chimiques (réactivité vis-à-vis de molécules sondes éventuelles).

### 6.2 Stratégie pour l'élaboration des capteurs

Pour chaque capteur développé, la stratégie est la même :

- ✓ Dans un premier temps, nous étudierons en phase liquide les propriétés optiques de la molécule à détecter. S'il s'agit d'un COV sans propriétés optiques intrinsèques, sa réactivité vis-à-vis d'une molécule sonde sera étudiée. Cette étape permet de connaître l'environnement favorable à la réaction et il sera reproduit dans une matrice solide.
- ✓ Une fois le cahier des charges établi pour la matrice solide, des xérogels sont synthétisés et fonctionnalisés avec différents groupements (basiques ou acides, hydrophiles ou hydrophobes, à

chaîne plus ou moins longue...). Cette fonctionnalisation permet d'ajuster l'environnement intrapore.

- ✓ Les xérogels synthétisés sont testés vis-à-vis d'atmosphères calibrées en COV afin d'évaluer leur efficacité. Puis ils sont utilisés dans la phase gazeuse générée par des cultures de bactéries, sur milieux gélosés ou en bouillon liquide.

Le chapitre 2 est dédié à la mise au point de capteurs de composés soufrés. Ces capteurs utilisent une réaction sonde-cible entre les composés soufrés et une molécule sonde. Les chapitres 3 et 4 sont consacrés à la détection de deux MCOV exogènes et leurs applications pour l'étude d'activités enzymatiques peptidases et glycosidases. Enfin, le chapitre 5 porte sur l'exploration d'un nouveau mode de lecture des capteurs : en réflexion plutôt qu'en transmission. Pour ces capteurs, un travail innovant de formulation et de mise en forme a été nécessaire.

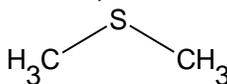
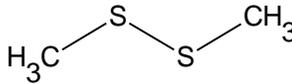
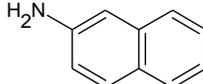
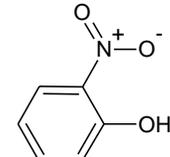
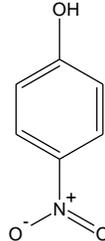
MCOV	Nature	détection		formule	Voies enzymatiques
<b>Composés Soufrés Volatils (chap II)</b>	endogène	Absorbance sonde (410 nm)	avec	Sulfure d'hydrogène H <sub>2</sub> S Méthanethiol H <sub>3</sub> C—SH Diméthylsulfure  Diméthyldisulfure 	Thiosulfate réductase
<b>β-naphthylamine (chap III)</b>	exogène	Fluorescence (λ <sub>ex</sub> = 335 nm, λ <sub>ém</sub> = 410 nm) Absorbance sonde (540 nm)	avec	β-naphthylamine 	L-alanine aminopeptidase
<b>Nitrophénols (chap IV)</b>	exogène	Absorbance 2-nitrophénol (360 nm et 415 nm) 4-nitrophénol (318 nm et 401 nm)		2-nitrophénol  4-nitrophénol 	β-glucuronidase, α-glucosidase, C8-esterase

Tableau 1.4 : COV et modes de détection étudiés.

## Références bibliographiques

- [1] V. Velusamy, K. Arshak, O. Korostynska, K. Oliwa, and C. Adley, "An overview of foodborne pathogen detection: In the perspective of biosensors," *Biotechnol. Adv.*, vol. 28, no. 2, pp. 232–254, Mar. 2010.
- [2] C. Vernozy-rozand, "Méthodes de détection rapide en microbiologie alimentaire." *Techniques de l'ingénieur*, F1 130, 1999.
- [3] "<http://www.mybiolumix.com/vial-description/>." consulté le 02/06/2015.
- [4] T. C. Thorpe, M. L. Wilson, J. E. Turner, J. L. DiGiuseppi, M. Willert, S. Mirrett, and L. B. Reller, "BacT/Alert: an automated colorimetric microbial detection system.," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 28, no. 7, pp. 1608–1612, 1990.
- [5] M. C. Easter, *Rapid microbiological methods in the pharmaceutical industry*, CRC Press. 2003.
- [6] J. d. Owens, D. s. Thomas, P. S. Thompson, and W. Timmerman, "Indirect conductimetry: a novel approach to the conductimetric enumeration of microbial populations," *Lett. Appl. Microbiol.*, vol. 9, no. 6, pp. 245–249, Dec. 1989.
- [7] T. P. Burg, M. Godin, S. M. Knudsen, W. Shen, G. Carlson, J. S. Foster, K. Babcock, and S. R. Manalis, "Weighing of biomolecules, single cells and single nanoparticles in fluid," *Nature*, vol. 446, no. 7139, pp. 1066–1069, 2007.
- [8] "<http://www.lifescleast.com/>." consulté le 02/06/2015.
- [9] M. Genua, "Combinatorial surface-based electronic tongue development : Analytical applications and conception of 2D and 3D biomimetic surfaces," Thèse de doctorat, Université de Grenoble, 2013.
- [10] P. N. Abadian, C. P. Kelley, and E. D. Goluch, "Cellular Analysis and Detection Using Surface Plasmon Resonance Techniques," *Anal. Chem.*, vol. 86, no. 6, pp. 2799–2812, Mar. 2014.
- [11] S. Bouguelia, Y. Roupioz, S. Slimani, L. Mondani, M. G. Casabona, C. Durmort, T. Vernet, R. Calemczuk, and T. Livache, "On-chip microbial culture for the specific detection of very low levels of bacteria," *Lab. Chip*, vol. 13, no. 20, pp. 4024–4032, Sep. 2013.
- [12] "[www.prestodiag.com/](http://www.prestodiag.com/)." consulté le 03/06/2015.
- [13] J. A. Washington, P. K. W. Yu, and W. J. Martin, "Evaluation of Accuracy of Multitest Micromethod System for Identification of Enterobacteriaceae," *Appl. Microbiol.*, vol. 22, no. 3, pp. 267–269, Sep. 1971.
- [14] "<http://ecatalogue-biomerieux.com/france/pharma/fo/category.php?fam=5>." consulté le 26/05/2015.
- [15] M. Polet, N. Botteldoorn, and K. Dierick, "MALDI-TOF comme outil d'identification de pathogènes alimentaires," *Agence fédérale pour la sécurité de la chaîne alimentaire (AFSCA), LABINFO N°13*, pp. 12–14, Avril-2015.
- [16] M. Pavlovic, "Application of MALDI-TOF MS for the Identification of Food Borne Bacteria," *Open Microbiol. J.*, vol. 7, no. 1, pp. 135–141, Nov. 2013.
- [17] G. J. Puppels, F. F. M. de Mul, C. Otto, J. Greve, M. Robert-Nicoud, D. J. Arndt-Jovin, and T. M. Jovin, "Studying single living cells and chromosomes by confocal Raman microspectroscopy," *Nature*, vol. 347, no. 6290, pp. 301–303, Sep. 1990.
- [18] J.-C. Baritoux, E. Schultz, A.-C. Simon, A.-G. Bourdat, I. Espagnon, P. Laurent, and J.-M. Dinten, "Fast and robust identification of single bacteria in environmental matrices by Raman spectroscopy," *Proc. SPIE - Prog. Biomed. Opt. Imaging*, vol. 9328, p. 93281I (10 pp.), 2015.
- [19] C. Kendall, H. Barr, and N. Magan, "CHAPTER 9. Volatile Analysis for Clinical Diagnostics," in *Detection Challenges in Clinical Diagnostics*, P. Vadgama and S. Peteu, Eds. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2013, pp. 222–237.

- [20] K. D. van de Kant, L. J. van der Sande, Q. Jöbsis, O. C. van Schayck, and E. Dompeling, "Clinical use of exhaled volatile organic compounds in pulmonary diseases: a systematic," 2012.
- [21] L. D. J. Bos, P. J. Sterk, and M. J. Schultz, "Volatile Metabolites of Pathogens: A Systematic Review," *PLoS Pathog.*, vol. 9, no. 5, p. e1003311, May 2013.
- [22] S. Schulz and J. S. Dickschat, "Bacterial volatiles: the smell of small organisms," *Nat. Prod. Rep.*, vol. 24, no. 4, p. 814, 2007.
- [23] P. F. Gao, F. Korley, J. Martin, and B. T. Chen, "Determination of unique microbial volatile organic compounds produced by five aspergillus species commonly found in problem buildings," *Aihaj*, vol. 63, no. 2, pp. 135–140, Apr. 2002.
- [24] L. Wady, A. Bunte, C. Pehrson, and L. Larsson, "Use of gas chromatography-mass spectrometry/solid phase microextraction for the identification of MVOCs from moldy building materials," *J. Microbiol. Methods*, vol. 52, no. 3, pp. 325–332, Mar. 2003.
- [25] M. Yoshioka, M. Kitamura, and Z. Tamura, "Rapid Gas Chromatographic Analysis of Microbial Volatile Metabolites," *Jpn. J. Microbiol.*, vol. 13, no. 1, pp. 87–93, Jan. 1969.
- [26] P. A. Guarino and A. Kramer, "Gas Chromatographic Analysis of Head-Space Vapors to Identify Micro-Organisms in Foods," *J. Food Sci.*, vol. 34, no. 1, pp. 31–37, Jan. 1969.
- [27] R. Bassette and T. Claydon, "Characterization of Some Bacteria by Gas Chromatographic Analysis of Head Space Vapors from Milk Cultures," *J. Dairy Sci.*, vol. 48, no. 6, p. 775–8, 1965.
- [28] R. A. Allardyce, V. S. Langford, A. L. Hill, and D. R. Murdoch, "Detection of volatile metabolites produced by bacterial growth in blood culture media by selected ion flow tube mass spectrometry (SIFT-MS)," *J. Microbiol. Methods*, vol. 65, no. 2, pp. 361–365, May 2006.
- [29] K. Persaud and G. Dodd, "Analysis of discrimination mechanisms in the mammalian olfactory system using a model nose," *Nature*, vol. 299, no. 5881, pp. 352–355, Sep. 1982.
- [30] J. Gardner and P. Bartlett, "A Brief-History of Electronic Noses," *Sens. Actuators B-Chem.*, vol. 18, no. 1–3, pp. 211–220, Mar. 1994.
- [31] G. F. Fine, L. M. Cavanagh, A. Afonja, and R. Binions, "Metal Oxide Semi-Conductor Gas Sensors in Environmental Monitoring," *Sensors*, vol. 10, no. 6, pp. 5469–5502, Jun. 2010.
- [32] S. H. Hosseini, S. H. A. Oskooei, and A. A. Entezami, "Toxic gas and vapour detection by polyaniline gas sensors," *Iran. Polym. J.*, vol. 14, no. 4, pp. 333–344, Apr. 2005.
- [33] G. E. Collins and L. J. Buckley, "Conductive polymer-coated fabrics for chemical sensing," *Synth. Met.*, vol. 78, no. 2, pp. 93–101, Mar. 1996.
- [34] "<http://www.alpha-mos.com>." consulté le 27/05/2015.
- [35] "<http://www.vaporsens.com/>." consulté le 24/07/2015.
- [36] M. C. Janzen, J. B. Ponder, D. P. Bailey, C. K. Ingison, and K. S. Suslick, "Colorimetric Sensor Arrays for Volatile Organic Compounds," *Anal. Chem.*, vol. 78, no. 11, pp. 3591–3600, Jun. 2006.
- [37] J. R. Carey, K. S. Suslick, K. I. Hulkower, J. A. Imlay, K. R. C. Imlay, C. K. Ingison, J. B. Ponder, A. Sen, and A. E. Wittrig, "Rapid Identification of Bacteria with a Disposable Colorimetric Sensing Array," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 133, no. 19, pp. 7571–7576, May 2011.
- [38] C. L. Lonsdale, B. Taba, N. Queralto, R. A. Lukaszewski, R. A. Martino, P. A. Rhodes, and S. H. Lim, "The Use of Colorimetric Sensor Arrays to Discriminate between Pathogenic Bacteria," *PLoS ONE*, vol. 8, no. 5, p. e62726, May 2013.
- [39] "[www.specifictchnologies.net](http://www.specifictchnologies.net)." consulté le 27/05/2015.
- [40] "<http://metabolomx.com/>." consulté le 25/07/2015.
- [41] B. J. Melde, B. J. Johnson, and P. T. Charles, "Mesoporous Silicate Materials in Sensing," *Sensors*, vol. 8, no. 8, pp. 5202–5228, Aug. 2008.
- [42] C. J. Brinker and G. W. Schetel, *Sol-gel science : The Physics and Chemistry of Sol-gel Processing*, Academic Press, Inc. 1990.

- [43] Wiliam Bamogo, "Capteurs chimiques à base de matrices nanoporeuses pour la détection de métabolites volatils de la tuberculose," Thèse de doctorat, Université Paris 11, 2015.
- [44] N. Leventis, I. A. Elder, D. R. Rolison, M. L. Anderson, and C. I. Merzbacher, "Durable Modification of Silica Aerogel Monoliths with Fluorescent 2,7-Diazapyrenium Moieties. Sensing Oxygen near the Speed of Open-Air Diffusion," *Chem. Mater.*, vol. 11, no. 10, pp. 2837–2845, Oct. 1999.
- [45] B. Johnson-White, M. Zeinali, K. M. Shaffer, C. H. Patterson Jr., P. T. Charles, and M. A. Markowitz, "Detection of organics using porphyrin embedded nanoporous organosilicas," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 22, no. 6, pp. 1154–1162, Jan. 2007.
- [46] A. Korpi, A.-L. Pasanen, P. Pasanen, and P. Kalliokoski, "Microbial growth and metabolism in house dust," *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, vol. 40, no. 1, pp. 19–27, Jan. 1997.
- [47] J. Nuccio, P. Seaton, and R. Kieber, "Biological production of formaldehyde in the marine-environment," *Limnol. Oceanogr.*, vol. 40, no. 3, pp. 521–527, 1995.
- [48] M. A. Eberhardt and J. M. Sieburth, "A colorimetric procedure for the determination of aldehydes in seawater and in cultures of methylotrophic bacteria," *Mar. Chem.*, vol. 17, no. 3, pp. 199–212, Oct. 1985.
- [49] S. Mariano, W. Wang, G. Brunelle, Y. Bigay, and T.-H. Tran-Thi, "Colorimetric detection of formaldehyde: A sensor for air quality measurements and a pollution-warning kit for homes," *Procedia Eng.*, vol. 5, pp. 1184–1187, 2010.
- [50] H. Paolacci, "Capteurs chimiques à transduction optique de polluants atmosphériques à base de matériaux nanoporeux : application au formaldéhyde et autres composés carbonylés," Thèse de doctorat, Paris 11, 2006.
- [51] H. Paolacci and T.-H. Tran-Thi, "Nanoporous direct optical transducing material for detecting aldehydes," WO2007031657, 2007.
- [52] "<http://www.etheralabs.fr/>." consulté le 20/07/2015.
- [53] M. N. Descamps, T. Bordy, J. Hue, S. Mariano, G. Nonglaton, E. Schultz, T. H. Tran-Thi, and S. Vignoud-Despond, "Real-time detection of formaldehyde by a sensor," *Sens. Actuators B-Chem.*, vol. 170, pp. 104–108, Jul. 2012.
- [54] J. Hue, M. Dupoy, T. Bordy, R. Rousier, S. Vignoud, B. Schaerer, T.-H. Tran-Thi, C. Rivron, L. Mughlerli, and P. Karpe, "Benzene and xylene detection by absorbance in the range of 10–100ppb application: Quality of indoor air," *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 189, pp. 194–198, Dec. 2013.
- [55] Y. Yamada, T. Nakamura, and K. Yano, "Optical Response of Mesoporous Synthetic Opals to the Adsorption of Chemical Species," *Langmuir*, vol. 24, no. 6, pp. 2779–2784, Mar. 2008.
- [56] S. Crunaire, P. R. Marcoux, L.-H. Guillemot, K.-Q. Ngo, F. Mallard, J.-P. Moy, and T.-H. Tran-Thi, "Discriminating Bacteria With Functionalised Nanoporous Xerogels," *Procedia Chem.*, vol. 6, pp. 125–131, 2012.
- [57] S. Crunaire and T.-H. Tran-Thi, "Material and method for trapping, detecting and quantifying heterocyclic aromatic compounds and others," WO 2011/058066 A1, 2011.
- [58] P. Marcoux, M. Dupoy, L. Guillemot, and T.-H. Tran-Thi, "Method for Classifying the Presence or Absence of a Microorganism in a Biological Medium," WO2013001465, Juin-2012.
- [59] L.-H. Guillemot, M. Vrignaud, P. R. Marcoux, C. Rivron, and T.-H. Tran-Thi, "Facile and fast detection of bacteria via the detection of exogenous volatile metabolites released by enzymatic hydrolysis," *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 15, no. 38, p. 15840, 2013.
- [60] S. Orenga, A. L. James, M. Manafi, J. D. Perry, and D. H. Pincus, "Enzymatic substrates in microbiology," *J. Microbiol. Methods*, vol. 79, no. 2, pp. 139–155, Nov. 2009.
- [61] M. Nakazono, H. Nohta, Y. Ohkura, and K. Sasamoto, "Chemiluminescent Assays for  $\beta$ -D-Galactosidase and Alkaline Phosphatase Using Novel Luminol Derivatives as Substrates," *Anal. Sci.*, vol. 8, no. 6, pp. 779–783, 1992.

- [62] L.-H. Guillemot, "Capteurs chimiques à base de matrices synthétisées par voie sol-gel et à transduction optique pour la détection de composés organiques volatils microbiens (mCOV)," Thèse de doctorat, Université Paris-Sud, 2012.
- [63] J. D. Perry and A. M. Freydière, "The application of chromogenic media in clinical microbiology: Application of chromogenic media," *J. Appl. Microbiol.*, vol. 103, no. 6, pp. 2046–2055, Jul. 2007.
- [64] J. D. Perry, A. Davies, L. A. Butterworth, A. L. J. Hopley, A. Nicholson, and F. K. Gould, "Development and Evaluation of a Chromogenic Agar Medium for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 42, no. 10, pp. 4519–4523, Oct. 2004.
- [65] S. Malhotra-Kumar, K. Haccuria, M. Michiels, M. Ieven, C. Poyart, W. Hryniewicz, and H. Goossens, "Current Trends in Rapid Diagnostics for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Glycopeptide-Resistant *Enterococcus* Species," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 46, no. 5, pp. 1577–1587, May 2008.
- [66] G. Zambardi and J.-M. Roche, "Reaction medium for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) bacteria," WO2011018589 A2, 2011.
- [67] "[http://www.oxid.com/UK/blue/prod\\_detail/prod\\_detail.asp?pr=CM1046](http://www.oxid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM1046)." consulté le 02/06/2015.
- [68] A. L. Demain, "Increasing enzyme production by genetic and environmental manipulations," *Methods Enzymol.*, vol. 22, no. C, pp. 86–95, 1971.
- [69] B. Brown, A. Fourneron, R. Deschomets, M. T. Lescure, and T. Sofia, "Evaluation of the automated TEMPO system for enumeration of *Escherichia coli* in food products." biomérieux USA.
- [70] J. R. Waters, "Apparatus for detecting biological activity," US 3 676 679, 1972.
- [71] K. S. Suslick, K. I. Hulkower, A. Sen, M. A. Sroka, and W. B. McNamara, "Method and apparatus for detecting ammonia from exhaled breath," US 2005/0171449 A1.
- [72] A. P. Snyder, M. Miller, D. B. Shoff, G. A. Eiceman, D. A. Blyth, and J. A. Parsons, "Enzyme-substrate assay for the qualitative detection of microorganisms by ion mobility spectrometry," *J. Microbiol. Methods*, vol. 14, no. 1, pp. 21–32, Sep. 1991.
- [73] N. J. C. Strachan and I. D. Ogden, "A rapid method for the enumeration of coliforms in processed foods by ion mobility spectrometry," *Lett. Appl. Microbiol.*, vol. 17, no. 5, pp. 228–230, 1993.
- [74] I. D. Ogden and N. J. C. Strachan, "Enumeration of *Escherichia coli* in cooked and raw meats by ion mobility spectrometry," *J. Appl. Bacteriol.*, vol. 74, no. 4, pp. 402–405, 1993.
- [75] E. Tait, J. D. Perry, S. P. Stanforth, and J. R. Dean, "Bacteria detection based on the evolution of enzyme-generated volatile organic compounds: Determination of *Listeria monocytogenes* in milk samples," *Anal. Chim. Acta*, vol. 848, pp. 80–87, Oct. 2014.
- [76] J. Dean, S. Stanforth, E. Tait, S. Reed, and J. D. Perry, "Analysis of pathogenic bacteria using exogenous volatile organic compound metabolites and optical sensor detection," *RSC Adv.*, 2015.
- [77] E. T. Kato, C. M. Yoshida, A. B. Reis, I. S. Melo, and T. T. Franco, "Fast detection of hydrogen sulfide using a biodegradable colorimetric indicator system," *Polym. Int.*, vol. 60, no. 6, pp. 951–956, Jun. 2011.
- [78] M. Manafi and W. Kneifel, "Rapid methods for differentiating Gram-positive from Gram-negative aerobic and facultative anaerobic bacteria," *J. Appl. Bacteriol.*, vol. 69, no. 6, pp. 822–827, 1990.



## Chapitre 2. Détection de Composés Soufrés Volatils (CSV)

---

<b>CHAPITRE 2. DETECTION DE COMPOSES SOUFRES VOLATILS (CSV)</b> .....	<b>39</b>
1. PERTINENCE DES CSV POUR LA DETECTION DE MICRO-ORGANISMES .....	41
1.1 <i>Les sources biologiques de CSV</i> .....	41
1.1.1 Production de CSV à partir d'acides aminés .....	41
1.1.2 Production de CSV par réduction d'espèces oxydées du soufre.....	41
1.2 <i>Méthode normalisée de détection de Salmonella dans les aliments</i> .....	42
2. METHODES DE DETECTION DES VSC, EN PARTICULIER H <sub>2</sub> S .....	44
2.1 <i>Généralités sur le sulfure d'hydrogène</i> .....	44
2.2 <i>Capteurs à base d'oxydes métalliques semi-conducteurs</i> .....	44
2.3 <i>Capteurs électrochimiques</i> .....	45
2.4 <i>Méthodes de détection optiques</i> .....	46
2.4.1 Fluorescence.....	46
2.4.2 Formation d'un précipité.....	46
2.4.3 Absorption dans l'UV-visible.....	47
3. CHOIX DE LA MOLECULE SONDE.....	48
4. ETUDE DE LA REACTION ENTRE LE REACTIF D'ELLMAN ET LES VSC EN MILIEU AQUEUX .....	52
5. SYNTHÈSE ET CARACTÉRISATIONS DES CAPTEURS DOPES AU DTNB.....	53
5.1 <i>Synthèse de xérogels pour la détection des VSC</i> .....	53
5.1.1 Détermination de la quantité d'APTES à introduire pour obtenir un pH intrapore de 7 .....	54
5.1.2 Synthèse de xérogels dopés avec du DTNB .....	55
5.2 <i>Caractérisation des xérogels dopés au DTNB</i> .....	55
6. EXPOSITION DES CAPTEURS A DES VSC GENERES CHIMIQUEMENT .....	57
7. MISE EN ŒUVRE DANS LA DETECTION DE VSC BACTERIENS.....	61
7.1 <i>Mise en évidence des VSC produits par Citrobacter freundii en conditions anaérobies</i> .....	61
7.1.1 Mise en évidence de la production de H <sub>2</sub> S par Citrobacter freundii .....	61
7.1.2 Cultures sur milieu gélosé.....	63
7.1.3 Suivi en continu de la production de sulfure d'hydrogène par Citrobacter freundii .....	65
7.2 <i>Mise en évidence de Salmonella dans des matrices alimentaires</i> .....	68
7.2.1 Dans une mayonnaise (produit à base d'œufs crus).....	68
7.2.2 Dans de la viande de poulet crue .....	71
7.2.3 Dans un camembert au lait cru.....	72
<i>Conclusion</i> .....	75
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	77

# 1. Pertinence des CSV pour la détection de micro-organismes

## 1.1 Les sources biologiques de CSV

De nombreux micro-organismes produisent des espèces volatiles soufrées (sulfure d'hydrogène, méthane-thiol, diméthylsulfure, diméthyl-disulfure, disulfure de carbone) par dégradation d'acides aminés soufrés et/ou réduction d'espèces oxydées du soufre.[1]

### 1.1.1 Production de CSV à partir d'acides aminés

Les CSV produits à partir de composés organiques soufrés sont majoritairement issus de la dégradation par une enzyme d'acides aminés soufrés tels que la L-cystathionine, L-cystéine, L-homocystéine et L-méthionine. L'enzyme L-méthionine  $\gamma$ -lyase, est produite par des bactéries comme *Pseudomonas putida*, *Trichomonas vaginalis* et *Citrobacter freundii*. Cette enzyme catalyse la réaction de  $\gamma$ -élimination de la L-méthionine et la  $\beta$ -élimination de la L-cystéine pour donner du méthane-thiol et du sulfure d'hydrogène respectivement. Enfin, l'activité d'enzymes méthyltransférases entraîne la formation de composés soufrés méthylés tels que le diméthylsulfure et le diméthyl-disulfure.

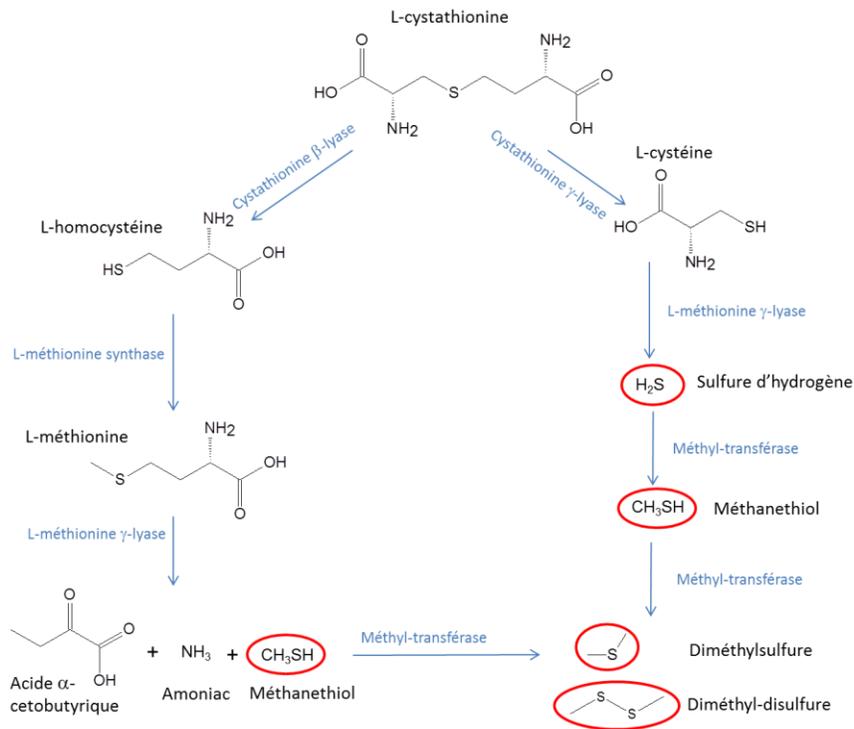


Figure 2.1 : Mécanismes de synthèse de composés volatils soufrés à partir d'acides aminés. [1]

### 1.1.2 Production de CSV par réduction d'espèces oxydées du soufre

La production de CSV peut aussi se faire par réduction d'espèces oxydées du soufre : les sulfates (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, nombre d'oxydation (n.o) = +VI), thiosulfates (S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>, atome de soufre central : n.o. = +V, atome de soufre périphérique : n.o. = -I) et sulfites (SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, n.o. = +IV). En conditions anaérobies, certaines

bactéries sont capables de remplacer l'oxygène par des espèces oxydées du soufre comme accepteur d'électrons. [2] En conditions aérobies, la réduction de l'oxygène génère de l'eau ; de manière similaire, en conditions anaérobies, la réduction d'espèces oxydées du soufre génère des sulfures (par exemple le sulfure d'hydrogène, H<sub>2</sub>S, n.o. = -II).

Les CVS sont des composés de choix pour la détection de micro-organismes pathogènes. Par exemple, le méthane thiol est émis par un grand nombre de pathogènes différents : *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*. [3] *Salmonella*, bactérie responsable de nombreuses toxi-infections alimentaires, produit du sulfure d'hydrogène. Cette propriété fait d'ailleurs l'objet d'un test de confirmation (isolement sur gélose XLD : formation d'un précipité noir Fe<sub>2</sub>S<sub>3</sub>) dans la procédure de détection de *Salmonella* dans les aliments détaillée ci-après.

## 1.2 Méthode normalisée de détection de *Salmonella* dans les aliments

Les infections à *Salmonella* constituent une préoccupation majeure des agences et organismes chargés de la sécurité sanitaire des aliments compte-tenu de leurs conséquences en santé publique et sur le plan économique. En France, en 2010, les salmonelles ont été responsables de 44% des toxi-infections alimentaires déclarées. [4] En Europe, ces bactéries demeurent la cause la plus fréquente d'épidémies d'origine alimentaire.

L'infection par ces bactéries se manifeste par une gastro-entérite aigüe. Le réservoir principal des salmonelles est l'animal. Ces bactéries peuvent être présentes dans le tube digestif des mammifères (porcs, bovins) et des oiseaux (volailles) sans que ceux-ci ne présentent de symptômes. La contamination de l'homme se fait généralement par le biais d'aliments souillés, mais aussi par contact avec des individus ou animaux infectés. La méthode normalisée ISO 6579 de 2002 décrit le protocole de recherche de *Salmonella* dans les aliments et nécessite quatre étapes (Figure 2.2).

- **Enrichissement non-sélectif** : au cours de cette première étape, l'échantillon à analyser (25 grammes) est dilué dans un milieu riche liquide (eau peptonée tamponnée). Ces cultures sont réalisées dans des sacs *Stomachers* qui sont agités violemment afin de décoller les bactéries de l'échantillon et d'homogénéiser le milieu de culture. L'objectif est de favoriser la récupération et la croissance des salmonelles qui ont pu être soumises au stress par les agents de conservation, le manque de nutriments, la chaleur ou le froid.
- **Enrichissement sélectif** : une partie de la pré-culture est ensuite diluée dans un milieu sélectif. Le but de cette étape est de favoriser la croissance des salmonelles par rapport aux autres micro-organismes. Ces milieux contiennent des inhibiteurs de bactéries comme le vert de malachite dans le RVS (Rappaport Vassiliadis) ou le vert brillant dans le MKTTn (Müller-Kauffmann au Tétrathionate-Novobiocine). Dans le RVS, un sel de Magnésium permet aux Salmonelles d'être moins sensibles au vert de malachite. Le MKTTn contient aussi de la novobiocine qui inhibe les *Proteus* et du tétrathionate qui inhibe les bactéries ne possédant pas de tétrathionate réductase.
- **Isolement sur milieu gélosé** : le but de cette étape est d'obtenir des colonies isolées de salmonelles. Des géloses sélectives et différentielles sont ensemencées avec le milieu de l'étape

d'enrichissement sélectif. Par exemple une gélose Xylose Lysine Déoxycholate (XLD) est sélective grâce au désoxycholate de sodium qui a pour effet d'inhiber les microorganismes Gram positifs. Il s'agit aussi d'une gélose différentielle sur laquelle il est possible, d'identifier les colonies de bactéries grâce à leur aspect. Pour cela, la gélose XLD contient de la lysine et du thiosulfate qui sont métabolisés en cadavérine et H<sub>2</sub>S respectivement par les salmonelles (enzymes lysine décarboxylase et thiosulfate réductase). La présence de cadavérine (pK<sub>a1</sub> = 10.05, pK<sub>a2</sub> = 10.93) entraîne une augmentation du pH. Un indicateur coloré, le rouge de phénol permet de mettre en évidence ce phénomène. Quant à H<sub>2</sub>S, sa présence est révélée grâce à la formation d'un précipité noir de sulfure métallique (Fe<sub>2</sub>S<sub>3</sub>) grâce à du citrate de fer introduit dans la gélose.

- **Identification par tests biochimiques** : les colonies isolées sur gélose sont soumises pour confirmation à des tests biochimiques pour être identifiées grâce aux enzymes qu'elles produisent. On peut citer par exemple les tests β-galactosidase, lysine décarboxylase, sulfate réductase, uréase.

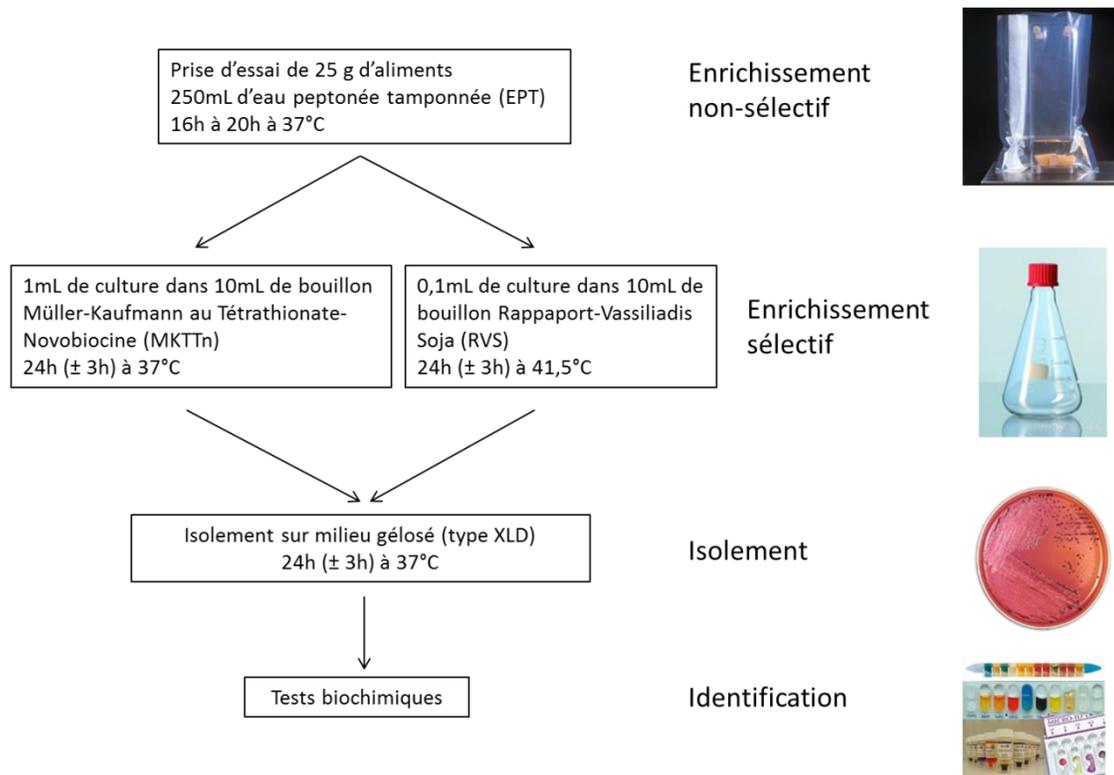


Figure 2.2: Procédure de détection de *Salmonella* (norme ISO 6579, 2002).

Cette procédure requiert plusieurs étapes nécessitant beaucoup de main d'œuvre ainsi qu'un grand nombre de consommables. Tous les échantillons, qu'ils soient positifs ou non à *Salmonella* subissent les trois premières étapes de la procédure. La très grande majorité des tests sont négatifs, ce qui signifie qu'un nombre important d'enrichissements sélectifs et d'isolements sont inutiles. La production d'H<sub>2</sub>S est une condition nécessaire mais non suffisante à la détection de *Salmonella*. Donc, un capteur de VSC employé dans la première étape d'enrichissement non sélectif en sac *Stomacher*

permettrait de mettre de côté les sacs où il y a émission de H<sub>2</sub>S. Toutes les cultures négatives à H<sub>2</sub>S pourront être éliminées car elles ne peuvent pas contenir de *Salmonella*, seule la petite fraction de sacs positifs à H<sub>2</sub>S subiront l'enrichissement sélectif et l'isolement.

## 2. Méthodes de détection des VSC, en particulier H<sub>2</sub>S

### 2.1 Généralités sur le sulfure d'hydrogène

Le sulfure d'hydrogène est produit en grande quantité par certaines activités industrielles. On peut citer comme exemple le raffinage du pétrole, l'exploitation du gaz naturel, le traitement des eaux usées, l'industrie papetière et l'agriculture. [5] Le sulfure d'hydrogène est un gaz incolore. Le nez humain est capable de détecter des concentrations autour de 0,01 ppm et 0,5 ppm (odeur d'œufs pourri). [5],[6] Absorbé via les voies respiratoires, il a des effets neurotoxiques. Une exposition à forte concentration (100 ppm et plus) a pour conséquences une paralysie du nerf olfactif, une paralysie du système respiratoire entraînant une asphyxie puis la mort. [6],[7] Le sulfure d'hydrogène est un inhibiteur d'enzymes telles que la cytochrome C oxydase dont le rôle est de transférer les électrons à l'oxygène afin de former de l'eau dans le processus de respiration. Des valeurs limites d'exposition sont fixées par l'Institut National de Recherche et de Sécurité pour la prévention des accidents du travail et des maladies professionnelles (INRS). La valeur moyenne d'exposition sur 8 heures est de 5 ppm et la valeur limite d'exposition sur 15 minutes est de 10 ppm. [5],[8]

Du fait de sa toxicité et de sa présence dans un grand nombre de processus industriels, il y a un intérêt grandissant pour le dosage d'H<sub>2</sub>S. Plusieurs méthodes analytiques ont été mises au point pour la détection de CSV comme la chromatographie en phase gazeuse. C'est le cas de l'analyseur MEDOR commercialisé par la société Chromatotec ; [9] l'analyse est réalisée par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (GC-FID). Si cette méthode a fait ses preuves en termes de sensibilité et sélectivité, elle requiert un équipement coûteux, une préparation de l'échantillon et une main d'œuvre qualifiée. Aujourd'hui, le marché s'oriente vers des capteurs bas coûts combinant facilité d'emploi, rapidité de réponse et sensibilité. Les technologies les plus utilisées sont les suivantes : capteurs à base d'oxydes métalliques semi-conducteurs (variation d'impédance ou de conductivité), les capteurs optiques (fluorescence, absorption), les capteurs électrochimiques. En plus de ces méthodes, on peut citer les capteurs à base de polymères conducteurs ou encore les capteurs piézoélectriques (microbalances à quartz). [10]

### 2.2 Capteurs à base d'oxydes métalliques semi-conducteurs

Ces capteurs sont basés sur l'affinité de H<sub>2</sub>S pour certains oxydes métalliques comme le dioxyde d'étain (SnO<sub>2</sub>), l'oxyde de fer (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), l'oxyde de zinc (ZnO), le trioxyde de tungstène (WO<sub>3</sub>) ou le dioxyde de titane (TiO<sub>2</sub>). Le gaz ciblé s'adsorbe à la surface de l'oxyde. Dans le cas d'un gaz réducteur (comme H<sub>2</sub>S), la résistance du matériau diminue s'il s'agit d'un semi-conducteur de type n (il y a apport de porteurs de charge : les électrons). Au contraire, la résistance augmente s'il s'agit d'un semi-conducteur de type p (le nombre de porteurs de charge, les « trous », diminue). [11]

Ces capteurs ont l'avantage d'être bas coût, sensibles, légers et petits, cependant, il est le plus souvent nécessaire de travailler à haute température. [10],[11] Afin d'être spécifiques, ces capteurs sont combinés dans des nez électroniques. La société AlphaMOS commercialise les nez FOX et Gemini ; de même Simtronics commercialise un nez électronique destiné à la surveillance en continu de procédés industriels (Multitox DG-TT7-S). [12] Ces nez électroniques sont sensibles mais chers et encombrants (FOX : 80 k€, Gemini : 50 k€). [13]

### 2.3 Capteurs électrochimiques

Les méthodes électrochimiques sont souvent avantageuses car elles sont sensibles et miniaturisables. Leur principe repose sur la diffusion de  $H_2S$  à travers une membrane perméable aux gaz, mais pas aux liquides. Une fois en solution dans une cellule électrochimique à trois électrodes le sulfure d'hydrogène est oxydé.

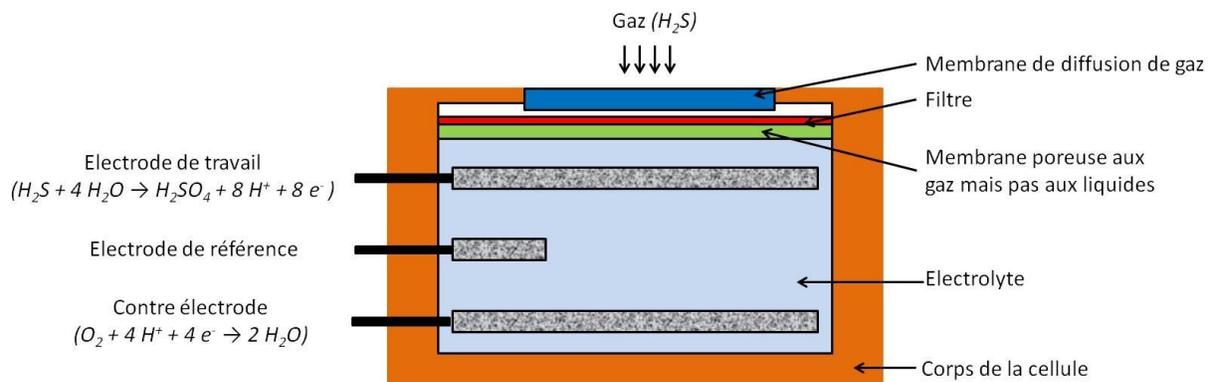


Figure 2.3: Principe de fonctionnement d'un détecteur électrochimique d' $H_2S$ . [8]

La détection par électrochimie se déroule en solution et nécessite un électrolyte support. Pour remédier au manque de sélectivité de ces méthodes, les capteurs sont équipés de membranes perméables souvent à base de polymères. Dans les travaux de Jeroschewski *et al.*, [14] l'oxydation et la détection d' $H_2S$  est réalisée grâce à l'intermédiaire du couple oxydo-réducteur ferri/ferrocyanure :  $[Fe(CN)_6]^{3-}/[Fe(CN)_6]^{4-}$ . Le sulfure d'hydrogène dissout traverse la membrane de polydiméthylsiloxane (PDMS) puis est oxydé en soufre élémentaire et l'ion ferrocyanure est formé. Ce dernier est à nouveau oxydé à l'électrode de travail, créant un courant qui est directement proportionnel à la quantité d' $H_2S$  dissout. Les méthodes électrochimiques existantes en solution ne sont pas transposables à la détection d'espèces gazeuses.

Plusieurs capteurs électrochimiques sont disponibles commercialement. La société Cairpol [15] commercialise un détecteur d' $H_2S$  : le Cairclip. La mesure est basée sur la concentration du gaz dissout ; la durée de vie de ce dispositif est d'un an (298 € l'unité). Ce capteur détecte à la fois  $H_2S$  et le méthane thiol entre 10 ppb et 1 ppm. La société Alphasense utilise la même méthode pour ses capteurs, dont le modèle portable H2SHA détecte entre 30 et 250 ppb en moins de 30 secondes (50€ l'unité). [16] La microélectrode Arrow  $H_2S$  (1592\$), commercialisée par les laboratoires LAZAR, mesure sélectivement jusqu'à 100 nmol/L d' $H_2S$  dans des volumes aussi faibles que la dizaine de microlitre. [17]

## 2.4 Méthodes de détection optiques

Les méthodes optiques ont l'avantage de pouvoir bénéficier d'une transduction directe et nécessitent peu d'instrumentation. Une interprétation visuelle, selon l'intensité de la couleur ou de la fluorescence, permet même une évaluation qualitative de la teneur en VSC. Différents types de détection optique existent : nous nous intéresserons particulièrement à la fluorescence et à la spectrophotométrie d'absorption UV-visible.

### 2.4.1 Fluorescence

En ce qui concerne la détection en fluorescence, deux cas peuvent être envisagés : l'apparition ou l'inhibition d'un signal de fluorescence lors de l'interaction d'une sonde avec la cible. Dans le cas où c'est l'inhibition de fluorescence qui est le signe de l'interaction avec un VSC, la sonde fluorescente peut être une molécule, comme une thionine [18] ou une fluorescéine modifiée à l'acétate de mercure [19]. Des solides colloïdaux comme des nanoparticules de CdSe ont également été employés. [7] L'inhibition de fluorescence est un mode de détection peu sensible (les meilleures limites de détection se situent autour de 10 pm).

L'apparition d'un signal de fluorescence donne des limites de détection bien meilleures, de l'ordre du ppb. Dans ce cas, des complexes du mercure sont souvent utilisés : l'interaction avec un sulfure provoque la libération d'un ligand fluorescent. Les composés utilisés sont par exemple l'acétate de mercure (II) de fluorescéine tétraoctylammonium (15 ppm, [20]) et le 2,2'-pyridylbenzimidazole de mercure (II) (200 ppb, [21]) (Figure 2.4). Cependant, cette technique fait appel à la complexation d'ions mercure, un métal toxique.

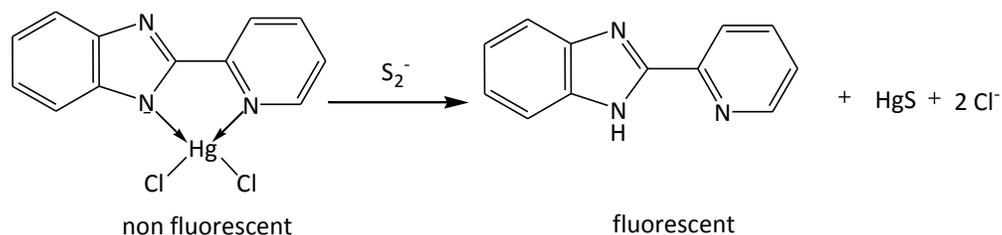


Figure 2.4: Mécanisme proposé pour la détection d'H<sub>2</sub>S grâce à la libération d'un composé fluorescent : le 2,2'-pyridylbenzimidazole [21]

### 2.4.2 Formation d'un précipité

La précipitation de sels métalliques est aussi souvent utilisée pour la détection d'H<sub>2</sub>S. Les sels métalliques utilisés sont l'acétate de plomb (formation d'un précipité noir de sulfure de plomb : PbS), le nitrate d'argent (formation d'un précipité noir de sulfure d'argent : Ag<sub>2</sub>S) ou des sels de Cadmium (formation d'un précipité jaune de sulfure de Cadmium : CdS). [22]

Les sels métalliques sont imprégnés sur différents supports. Ainsi, des bandelettes de papier imprégnées d'acétate de plomb sont disponibles commercialement pour la détection d'H<sub>2</sub>S. [23],[22] Une limite de détection de 100ppm peut être obtenue en incorporant du sulfate de fer (II) dans une matrice de chitosan. Le sulfate de fer réagit avec H<sub>2</sub>S pour former un précipité noir de FeS. [24] Des

colloïdes d'argent ont aussi été déposés sur du PVC. En présence d'H<sub>2</sub>S, le colloïde jaune devient bleu-noir. Cette réaction est suivie *via* l'absorbance à 420 nm. [25]

Dans l'industrie, des badges sont destinés au personnel pouvant se trouver en présence d'H<sub>2</sub>S. Les badges CHROMair commercialisés par Morphix Technologies détectent entre 1 et 240 ppm d'H<sub>2</sub>S dans l'air ambiant et coûtent 10 \$ l'unité. Portés par le personnel, ces badges changent de couleur en présence d'H<sub>2</sub>S par précipitation de sels métalliques adsorbés sur une membrane. Cette propriété est utilisée dans les tests H<sub>2</sub>S des galeries API 20E (bioMérieux) : le sulfure d'hydrogène produit par des microorganismes en solution précipite avec des ions ferriques (Fe<sup>3+</sup>) pour donner un solide noir (Fe<sub>2</sub>S<sub>3</sub>).



Figure 2.5: Galerie API 20E (bioMérieux) avec un test positif à H<sub>2</sub>S (formation d'un précipité noir)

Si beaucoup de ces dispositifs sont sensibles à l'humidité ou à la chaleur, un des principaux inconvénients est qu'ils sont souvent basés sur des métaux lourds. De plus, la formation d'un précipité ne permet pas d'avoir une mesure quantitative de la quantité de VSC.

### 2.4.3 Absorption dans l'UV-visible

Un des avantages d'une détection par absorption est de pouvoir suivre visuellement de manière qualitative la détection d'H<sub>2</sub>S, ou de manière quantitative par spectroscopie d'absorption UV-visible.

Un grand nombre de capteurs colorimétriques sont basés sur le caractère réducteur d'H<sub>2</sub>S : la réduction d'un indicateur colorimétrique redox provoque un changement de couleur. Par exemple, le 2,6-dichlorophénolindophénol, se décolore après réduction. La détection d'H<sub>2</sub>S se fait alors *via* une augmentation de la réflectance à 520 nm. [26] De même, pour la toluidine bleue, qui, en passant de bleu à incolore permet la détection d'H<sub>2</sub>S. [27] Pour certains indicateurs colorimétriques redox, les deux formes, oxydée et réduite, sont absorbantes dans le visible. C'est le cas de la résazurine (bleue sous forme oxydée) qui devient rose une fois réduite en résorufine par H<sub>2</sub>S. [28]

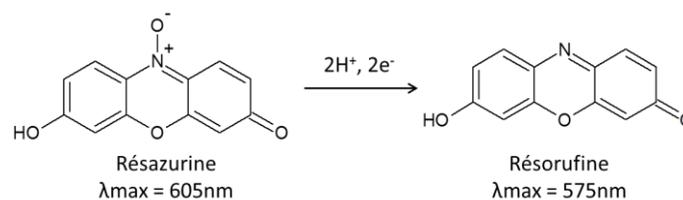


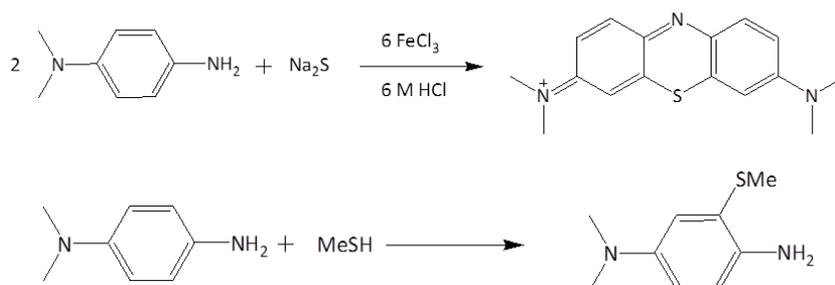
Figure 2.6: Réduction de la résazurine en résorufine

Les ions cuivre peuvent également former des complexes dont le spectre d'absorbance change suivant l'état d'oxydation du cuivre. Ainsi des chromophores à base de cuivre ont été incorporés dans des films minces de polymère (polysiloxane avec des fonctions acrylates). Le chromophore est un complexe de Cu (II) absorbant à 350 nm. La réduction du Cu (II) par H<sub>2</sub>S entraîne la formation du

complexe de Cu (I), qui lui absorbe à 464 nm. De tels films permettent de détecter 10 ppm de H<sub>2</sub>S gazeux en 10 min. [29] D'autres exemples impliquant des complexes de cuivre en tant que molécule sonde sont mentionnés dans la littérature, comme la réduction de néocuproïne de Cu (II) (vert) en néocuproïne de Cu (I) (jaune), [30] ou encore la réduction par H<sub>2</sub>S ou MeSH de complexes de Cu (I) porteurs de groupements perfluorés (changement de couleur du jaune au noir). [31] Ces méthodes sont basées sur une réaction rédox peu spécifique. En outre, la toxicité des complexes du cuivre est aujourd'hui reconnue. [32]

La détection d'H<sub>2</sub>S en solution par formation de bleu de méthylène, permet de s'affranchir de ces inconvénients. [33][34] Le sulfure d'hydrogène réagit avec deux molécules de N,N-diméthylparaphénylènediamine (DMPD) oxydées en quinonediimines. [35] Cette réaction forme du bleu de méthylène (MB) caractérisé par deux bandes d'absorption, à 668 nm ( $\epsilon = 76000 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ) et 745 nm ( $\epsilon = 64000 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ), correspondant respectivement à la forme cationique MB<sup>+</sup> et protonée MBH<sup>2+</sup>. Les coefficients d'extinction molaires élevés sont un avantage pour pouvoir détecter de faibles quantités de bleu de méthylène formé. En outre, la forme MB<sup>+</sup> émet en fluorescence à 690 nm pour une excitation à 640 nm, ce qui autorise une détection en fluorescence. [36] Les alcanethiols, comme le méthaneithiol, réagissent également avec la DMPD oxydée, le produit formé est rouge et absorbe autour de 500 nm. [37]

La DMPD a été immobilisée sous sa forme oxydée dans un xérogel. [35] La surface spécifique importante du xérogel permet d'obtenir une grande surface de contact entre la molécule sonde et le gaz. De plus, la transparence du xérogel permet une détection en absorbance aisée. Cependant, la quinonediimine est sensible à l'hydrolyse et se dégrade en partie lors de la préparation du xérogel (synthèse et séchage). A cela s'ajoute le fait qu'il est nécessaire de réunir deux molécules sonde pour une molécule de sulfure d'hydrogène à l'intérieur d'un pore de 1 à 5 nm de diamètre. Les contraintes exposées ci-dessus expliquent pourquoi des xérogels dopés avec de la DMPD et un oxydant sont peu sensibles vis-à-vis de H<sub>2</sub>S : leur limite de détection est autour de 1000 ppm.



**Figure 2.7: Equations bilans de la formation des réactions entre la DMPD oxydée et disulfure de sodium (sulfure d'hydrogène en solution acide) et entre la DMPD oxydée et le méthaneithiol**

### 3. Choix de la molécule sonde

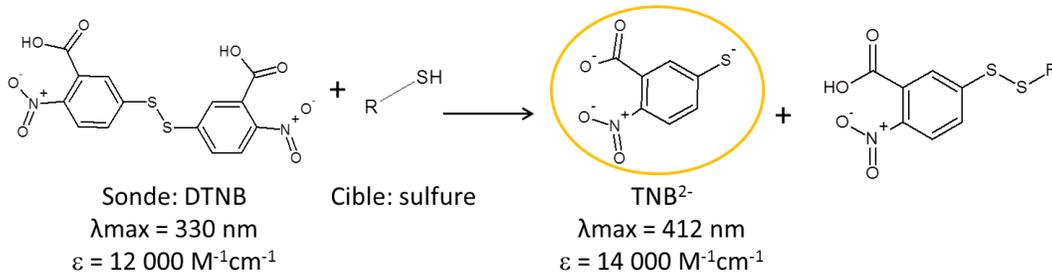
La DMPD s'est révélée une sonde peu probante à cause de sa faible stabilité une fois oxydée et de la stœchiométrie sonde/cible = 2/1. De ce fait, une nouvelle molécule sonde, l'acide 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoïque), appelé DTNB ou « réactif d'Ellman », a été envisagée pour la détection des VSC.

La molécule sonde doit répondre au cahier des charges suivant :

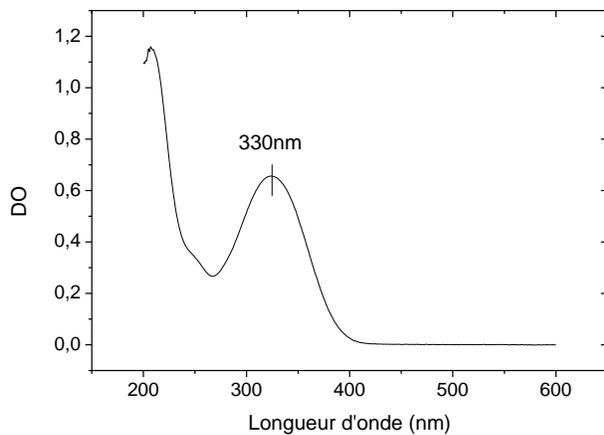
- La réaction sonde-cible doit être rapide avec un bon rendement.
- La molécule sonde doit réagir spécifiquement avec le composé volatil visé.
- Le produit de la réaction doit avoir des propriétés optiques différentes de celles de la molécule sonde ; avec idéalement un coefficient d'extinction molaire élevé (dans le cas d'une détection en absorbance).

Le DTNB présente un pic d'absorbance à 330 nm (Figure 2.8.B). En présence de thioalcanes, le pont disulfure du DTNB est rompu et un thiophénol est formé, l'acide 2-nitro-5-thiobenzoïque (TNB). Cette réaction est rapide et stœchiométrique. Le pKa entre les formes  $\text{TNB}^-$  et  $\text{TNB}^{2-}$  est de 4,57. La forme  $\text{TNB}^-$  absorbe à 328 nm et le dianion  $\text{TNB}^{2-}$  absorbe à 412 nm avec un coefficient d'extinction molaire de  $14150 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  (produit jaune-orange) (Figure 2.8). [38],[39] Ce sera donc ce dernier qui sera intéressant pour une détection en absorbance dans le visible.

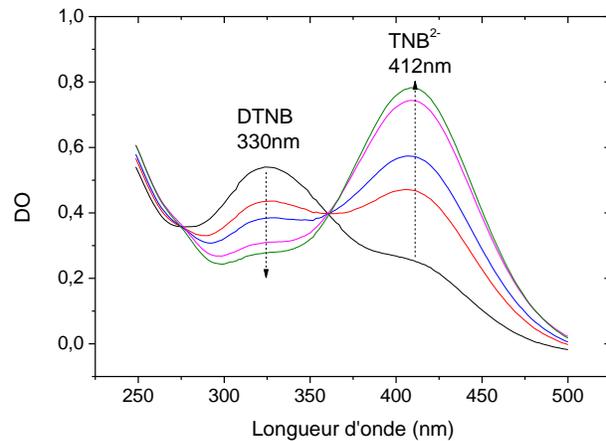
A)



B)

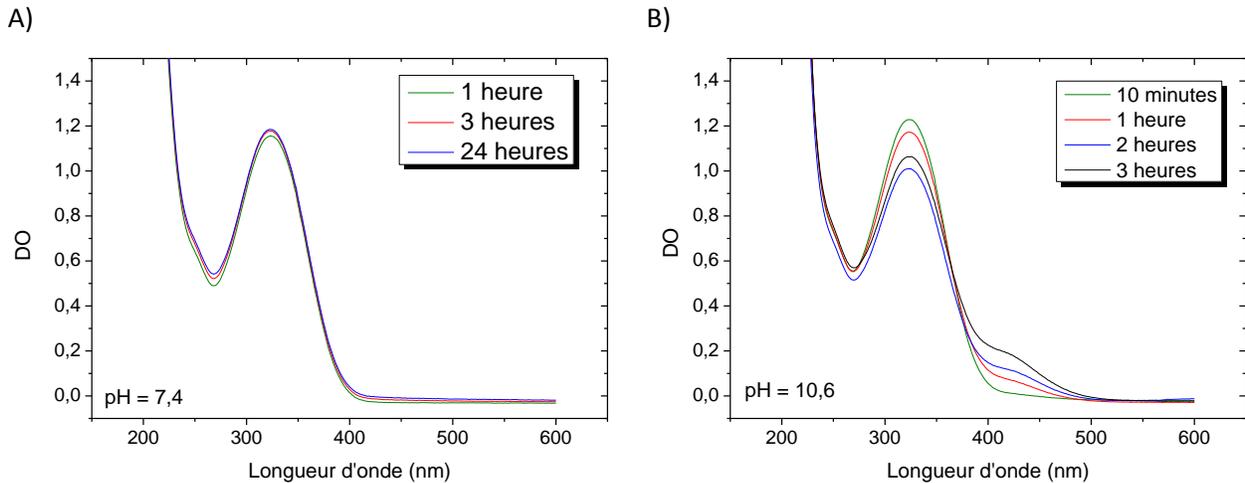


C)



**Figure 2.8: A) Rupture du pont disulfure du DTNB par un composé soufré libérant ainsi un dérivé thiophénolique coloré (TNB) B) Spectre UV-visible du DTNB  $5.10^{-5} \text{ mol/L}$  dans l'eau tamponnée à  $\text{pH} = 7.4$  (tampon phosphate  $0.2 \text{ mol/L}$ ), C) Suivi spectrophotométrique de la réaction entre le DTNB ( $5.10^{-5} \text{ mol/L}$ ) et le sulfure de sodium ( $\text{Na}_2\text{S}$ ,  $5.10^{-4} \text{ mol/L}$ ) à  $\text{pH} = 7.4$  (tampon phosphate  $0.2 \text{ mol/L}$ ) : disparition du pic du DTNB à 330 nm et apparition du pic du  $\text{TNB}^{2-}$  à 412 nm.**

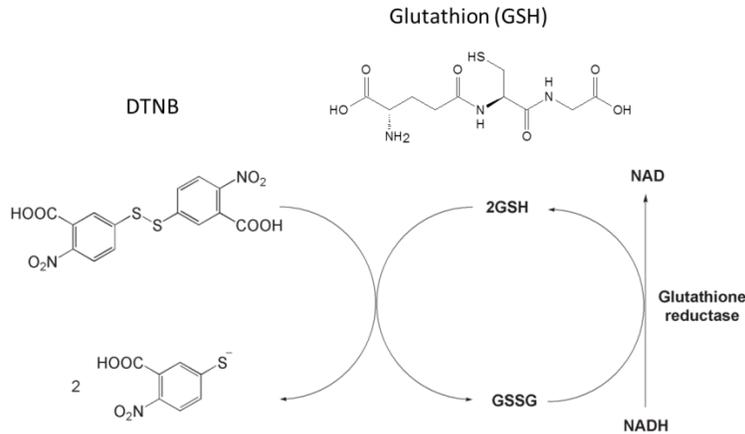
Il est important de noter qu'à pH basique, la rupture du pont disulfure se fait d'elle-même en quelques heures, conduisant à une augmentation de l'absorbance à 412 nm (Figure 2.9.B). [39]



**Figure 2.9: Evolution spectrale au cours du temps d'une solution de DTNB  $1.10^{-4}$  mol/L dans l'eau A) A pH 7,4 (tampon phosphate 0,2 mol/L), B) A pH 10,6 (ajusté avec NaOH).**

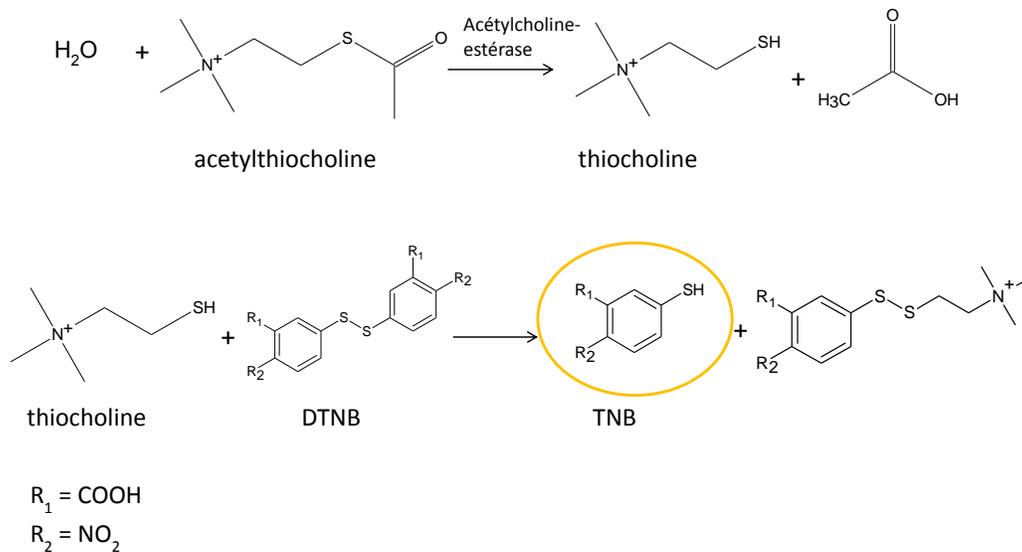
La réactivité du DTNB vis-à-vis des composés soufrés est couramment utilisée pour la détection de protéines ou de peptides contenant des groupements thiols.[40]

C'est le cas du glutathion, un tripeptide formé par la condensation d'acide glutamique, de cystéine et de glycine. Le glutathion, qui existe sous forme oxydée et réduite, intervient dans le maintien du potentiel redox du cytoplasme de la cellule. [41] Il réagit avec le DTNB *via* sa fonction thiol pour former le produit absorbant  $TNB^{2-}$ , la concentration en glutathion est alors mesurée par mesure de l'absorbance à 412 nm. [42] Pour détecter des concentrations faibles de glutathion, il est possible d'utiliser le deuxième produit de la réaction : le disulfure de glutathion (GSSG). Il peut être réduit à nouveau en glutathion par une enzyme glutathion réductase en présence de nicotinamide adénine dinucléotide réduite (NADH) (Figure 2.10). Ce système de recyclage du produit GSSG permet de générer deux fois plus de  $TNB^{2-}$  absorbant et donc d'augmenter sensiblement la sensibilité. Des kits sont disponibles commercialement. [43],[44]



**Figure 2.10: Réactions utilisées pour le dosage du glutathion**

L'activité de l'enzyme acétylcholine-estérase peut également être suivie. [45],[46],[47] Cette enzyme catalyse la réaction d'hydrolyse d'un neurotransmetteur, l'acétylcholine, en choline et acide acétique. Cette réaction permet à un neurone cholinergique de revenir à son état de repos après l'activation. Dans le cas où le substrat est une acétylthiocholine, il est possible de suivre la formation du produit d'hydrolyse, la thiocholine, par réaction avec le DTNB (Figure 2.11). De la même manière, des neurotoxines inhibitrices de l'acétylcholine-estérase peuvent être détectées en mesurant l'activité résiduelle de l'enzyme grâce à du DTNB adsorbé dans un film de silice sol-gel. [48]



**Figure 2.11: Réactions de dosage de l'activité de l'acétylcholine-estérase**

La réaction n'est pas sélective car le DTNB détecte à la fois les thiols (thioalcanes et thiophénols), les thiosulfates et les sulfures. [49],[50] Il s'agit donc d'une sonde pour la détermination des produits soufrés totaux.

## 4. Etude de la réaction entre le réactif d'Ellman et les VSC en milieu aqueux

Deux VSC modèles ont été choisis : le sulfure d'hydrogène ( $H_2S$ ) et le méthanethiol ( $CH_3SH$ ). Les  $pK_a$  des couples  $H_2S/HS^-$  et  $HS^-/S^{2-}$  sont 7,04 et 12,1 respectivement. [51] Le  $pK_a$  du couple  $CH_3SH/CH_3S^-$  est de 10,4. [52]

L'étude n'a pas été réalisée à pH acide pour deux raisons :

- A pH acide, ces composés sont sous leurs formes protonnées ( $H_2S$  et  $CH_3SH$ ) peu solubles dans l'eau.
- A pH inférieur au  $pK_a$  du couple  $TNB^-/TNB^{2-}$  (4,57), le TNB serait sous la forme  $TNB^-$ , absorbante à 328 nm, donc pas intéressante pour une détection dans le visible. [39]

En outre, la rupture du pont disulfure de la molécule sonde se fait d'elle-même en milieu basique, l'étude en solution aqueuse a donc été réalisée à pH neutre ( $pH = 7,4$  ; tampon phosphate 0,2 mol/L). A ce pH, les réactifs sont sous la forme  $HS^-$  et  $CH_3SH$  et le produit formé sera sous la forme  $TNB^{2-}$  absorbante dans le visible à 412 nm.

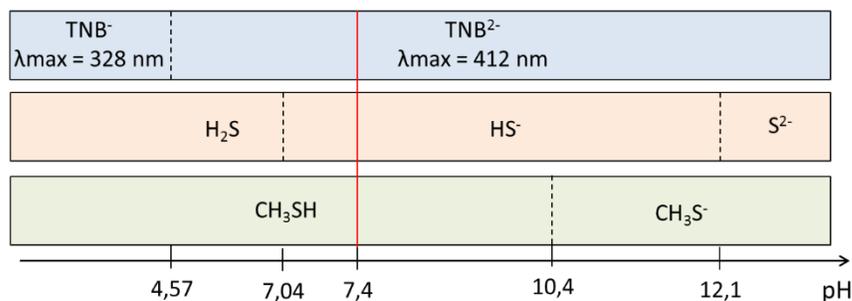


Figure 2.12 : Zones de stabilité des composés utilisés en fonction du pH.

Les réactifs utilisés sont les sels de sodium :  $Na_2S$  et  $CH_3SNa$ , et ont été introduits dans les proportions suivantes :  $C(DTNB) = 5.10^{-5} \text{ mol/L}$  et  $C(Na_2S, CH_3SNa) = 5.10^{-4} \text{ mol/L}$ . La réaction entre les composés soufrés et le DTNB est rapide, ce qui est une condition nécessaire pour une réaction sondable. L'équilibre est atteint en moins de cinq minutes pour les deux composés soufrés étudiés (Figure 2.13). Avec le sulfure d'hydrogène, la réaction est totale : la quantité de  $TNB^{2-}$  formé correspond à la quantité de DTNB introduit.

La réaction avec le méthanethiol a un rendement moins bon que celle avec le disulfure de sodium (Figure 2.13). A pH 7,4, le méthanethiol est sous sa forme protonnée. Etant donnée sa constante de Henry relativement élevée ( $H_{cc} = 1,23.10^{-1}$ ), une fraction du méthanethiol introduit est passé en phase gazeuse et ne réagit pas avec la molécule sonde. Cette fraction peut être estimée à l'aide de la loi de Henry à l'équilibre thermodynamique en sachant que le volume de solution aqueuse est de 10 mL avec un volume mort de 5mL :

- D'une part la quantité totale introduite se répartit entre phase gazeuse et phase aqueuse :

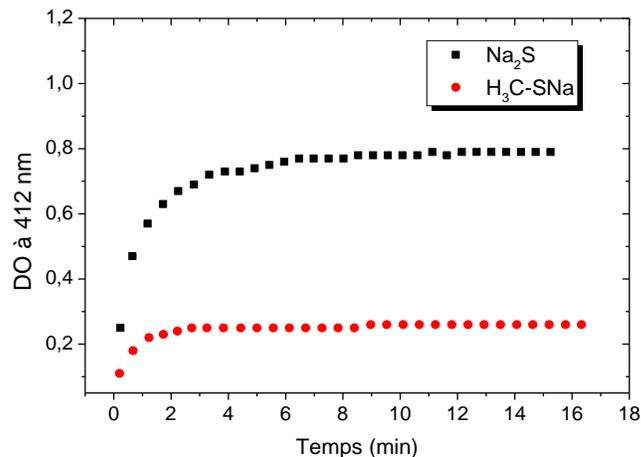
$$n_{\text{tot}} = n_{\text{gaz}} + n_{\text{aq}}$$

- D'autre part, la répartition entre phase gazeuse et phase aqueuse est régie par l'équilibre de

$$\text{Henry : } H_{cc} = \frac{C_{\text{gaz}}}{C_{\text{aq}}} = 1,23 \cdot 10^{-1}$$

Ces deux équations nous permettent de calculer la concentration dans la phase aqueuse :  $C_{\text{aq}} = 4,71 \cdot 10^{-4}$  mol/L et la concentration dans la phase gazeuse :  $C_{\text{gaz}} = 5,79 \cdot 10^{-5}$  mol/L.

La concentration en phase aqueuse en méthanethiol n'est donc pas diminuée drastiquement ; de plus le méthanethiol a été introduit en large excès (10 fois plus que de DTNB). Le fait que la quantité de  $\text{TNB}^{2-}$  formé soit plus faible avec  $\text{CH}_3\text{SH}$  est donc dû à une rupture plus difficile du pont disulfure du DTNB qu'avec  $\text{H}_2\text{S}$ .



**Figure 2.13: Rendements de réaction en solution aqueuse à pH = 7,4 pour les réactions sonde-cible :  $\text{CH}_3\text{SNa}$  ( $5 \cdot 10^{-4}$  mol/L); et DTNB ( $5 \cdot 10^{-5}$  mol/L);  $\text{Na}_2\text{S}$  ( $5 \cdot 10^{-4}$  mol/L); et DTNB ( $5 \cdot 10^{-5}$  mol/L);**

Il est important de noter que la molécule sonde et le produit formé absorbent à des longueurs d'ondes assez proches (respectivement 330 nm et 412 nm) avec des coefficients d'extinction molaire comparables (respectivement  $13000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  et  $14150 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ). Cela impose de ne pas trop doper les xérogels en molécule sonde pour que l'absorbance de cette dernière n'entrave pas la détection du produit. En présence d'une faible quantité de sulfure, le pic d'absorbance du TNB formé à 412 nm ne pourra être visible que par un épaulement sur le pic de la molécule sonde.

## 5. Synthèse et caractérisations des capteurs dopés au DTNB

### 5.1 Synthèse de xérogels pour la détection des VSC

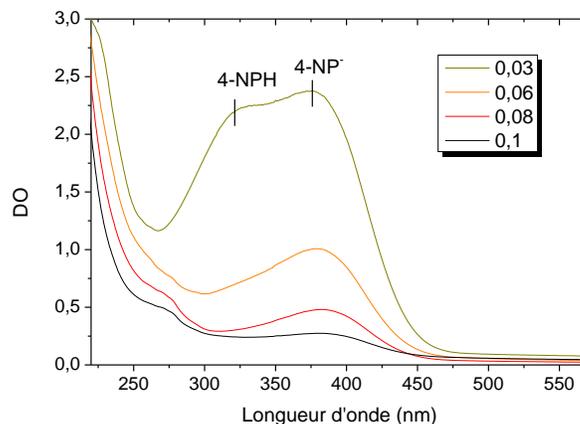
Pour la préparation de capteurs destinés à détecter les sulfures, le précurseur alcoxyde de silicium choisi est le tétraméthylorthosilicate (TMOS). Comme le TMOS est peu miscible à l'eau, le

méthanol est choisi pour jouer le rôle de co-solvant. Un organo-alcoxysilane contenant une fonction amine, le 3-aminopropyltriéthoxysilane (APTES) est ajouté. Cet organo-alcoxysilane permet à la fois de contrôler la taille des pores et d'ajuster le pH apparent dans les pores grâce à la fonction amine afin que ce pH soit proche de 7.

### 5.1.1 Détermination de la quantité d'APTES à introduire pour obtenir un pH intrapore de 7

L'équivalent d'un « pH intrapore », ou pH de surface des pores, a été déterminé pour des xérogels contenant différentes quantités d'APTES par adsorption d'un indicateur coloré de pH volatil. Cet indicateur coloré volatil est le 4-nitrophénol (4-NP) dont le  $pK_a$  est de 7,15. Sous sa forme moléculaire (à  $pH < 7,15$ ), le 4-NP absorbe à 317 nm ( $\epsilon = 8300 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ), et sous sa forme déprotonée ( $pH > 7,15$ ), à 401 nm ( $\epsilon = 18100 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ). Des xérogels contenant différentes quantités d'APTES ont été synthétisés : le ratio TMOS/MeOH/H<sub>2</sub>O reste constant à 1/5/4 ; le ratio d'APTES varie entre 0,03 et 0,1.

Les xérogels obtenus sont exposés à 100 ppm de 4-NP généré par évaporation rapide d'une solution éthanolique de 4-NP (protocole détaillé en Annexe 6.2). Un spectre UV-visible des xérogels est mesuré après 24 heures d'exposition (Figure 2.14).



**Figure 2.14 : Spectre d'absorption UV-visible de xérogels exposés à 100 ppm de 4-nitrophénol pendant 24 heures. Les xérogels TMOS/MeOH/APTES/H<sub>2</sub>O = 1/5/X/4 contiennent différents ratio d'APTES, X, variant de 0,03 à 0,1.**

Sur les spectres, on constate que lorsque la quantité d'APTES augmente dans les xérogels, le ratio entre nitrophénol moléculaire et déprotonné diminue. Il est possible de calculer une valeur de pH intrapore en estimant le ratio des deux formes du 4-NP. Pour chaque spectre, la ligne de base correspondant à l'absorption intrinsèque du xérogel a été soustraite et les pics des deux formes du 4-NP ont été déconvolués (le calcul est détaillé en Annexe 6.2). La concentration en 4-NP a été mesurée en normalisant l'absorbance pour chaque forme du 4-NP par le coefficient d'extinction molaire correspondant et par l'épaisseur des xérogels (2 mm). Nous avons fait ici l'hypothèse que les coefficients d'extinction molaire des deux formes du 4-NP sont les mêmes en xérogel que ceux mesurés en solution

aqueuse. Une valeur de pH de surface a pu être déduite de ces concentrations :  $pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[AH]}$

Ainsi, la formulation de xérogel qui contient un ratio d'APTES de 0,03 a été retenue.

Ratio d'APTES introduit	Concentration en 4-NP moléculaire (mol/L)	Concentration en 4-NP déprotoné (mol/L)	pH intrapore
0,03	$7,6 \cdot 10^{-04}$	$5,5 \cdot 10^{-04}$	7,01
0,06	$9,60 \cdot 10^{-05}$	$2,1 \cdot 10^{-4}$	7,5
0,08	0	$9,7 \cdot 10^{-5}$	> 8
0,1	0	$3,9 \cdot 10^{-05}$	> 8

**Tableau 2.1 : Concentrations en 4-NP moléculaire et déprotonné dans les différents xérogels et pH de surface déduits**

### 5.1.2 Synthèse de xérogels dopés avec du DTNB

Les rapports molaires choisis entre le précurseur alcoxysilane (TMOS), le méthanol (MeOH), le 3-aminopropyltriéthoxysilane (APTES) et l'eau sont les suivants : TMOS/MeOH/APTES/eau = 1/5/0,03/4. La molécule sonde (le DTNB) étant soluble dans le méthanol, elle est incorporée via la phase alcoolique. Le sol est finalement coulé dans des moules pour obtenir des monolithes parallélépipédiques. D'après les résultats obtenus en solution, deux paramètres doivent être étudiés pour le dopage et l'élaboration du capteur :

- La concentration en DTNB : il faut une concentration suffisante pour pouvoir observer un changement de couleur. Or, si la concentration est trop élevée, le pic d'absorbance de la molécule sonde à 330 nm pourrait gêner la détection du produit à 412nm.
- L'épaisseur du monolithe : la réaction sonde-cible se fait d'abord sur les faces du monolithe en contact avec le gaz. Dans un capteur épais, les molécules sondes situées au centre du monolithe ne réagissent qu'après diffusion des VSC vers le cœur du capteur. Or, lors d'une mesure d'absorbance, ces molécules sondes participent à l'absorbance à 330 nm.

Plusieurs formulations de sols sont préparées prenant en compte ces paramètres. La synthèse est détaillée en Annexe 3.1. Lors du séchage, les gels subissent un rétrécissement d'un facteur 2 dans toutes les dimensions (soit un facteur 8 en volume). La concentration en molécule sonde sera exprimée en mol/L de solide poreux obtenu. Des monolithes contenant  $8 \cdot 10^{-2}$  mol/L et  $8 \cdot 10^{-3}$  mol/L ont été synthétisés, au-delà de  $8 \cdot 10^{-2}$  mol/L, la concentration élevée dans le solide entraîne une précipitation de la molécule sonde au cours du séchage ce qui mène à des xérogels fissurés et opaques.

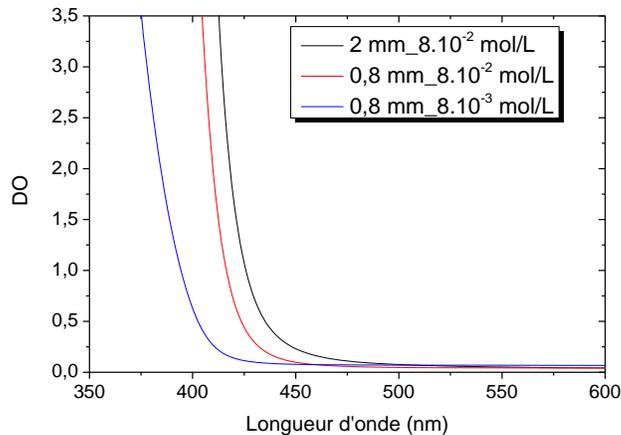
Les monolithes obtenus avec des concentrations inférieures ou égales à  $8 \cdot 10^{-2}$  mol/L sont transparents et ont une couleur jaune plus ou moins marquée suivant l'épaisseur et la concentration en molécule sonde.

## 5.2 Caractérisation des xérogels dopés au DTNB

Suivant la loi de Beer-Lambert ( $A = \epsilon LC$ ), les xérogels les plus épais et avec une plus forte concentration en DTNB, ont une absorbance plus importante à 330 nm (Figure 2.15). Ce pic

d'absorbance « déborde » dans le visible. A priori, l'apparition du  $TNB^{2-}$  après réaction avec les composés soufrés se verra mieux pour les xérogels dont l'absorbance est la plus faible, c'est-à-dire avec un dopage léger en DTNB. Cependant, en dopant fortement le xérogel, une molécule soufrée aura statistiquement plus de chances de rencontrer une molécule de DTNB et de former le produit coloré.

Le choix du capteur se fera donc sur un compromis entre une absorbance faible dans le visible et une bonne réactivité du capteur vis-à-vis des CSV qui sera testée dans le paragraphe 6.



**Figure 2.15 : Spectres d'absorption UV-visible de xérogels de différentes épaisseurs avec un dopage plus ou moins important en DTNB**

Les isothermes d'adsorption d'azote ont été établies à 77 K pour des xérogels contenant ou non  $8.10^{-2}$  mol/L de DTNB. Les xérogels sont broyés et dégazés pendant 24 heures sous vide à 50°C. Le volume poreux correspond au volume total de tous les pores. Il est obtenu par mesure du volume d'azote adsorbé ( $V_i$ ) lorsque la pression partielle ( $P/P_0$ ) tend vers 1. On suppose alors que le volume d'azote adsorbé sur les surfaces autres que les parois des pores est négligeable par rapport au volume de gaz condensé dans les pores. Le volume poreux total est donné par  $V_i$ . Les surfaces spécifiques ont été déduites en utilisant la méthode de Brunauer, Emmet et Teller (BET) et les répartitions de la taille des pores données à la Figure 2.16.B sont déterminées à l'aide de la théorie de la fonctionnelle de densité (DFT). Ces méthodes sont détaillées en Annexe 4.

Les isothermes mesurées (Figure 2.16.A) sont caractéristiques de matériaux mésoporeux avec une hystérésis due à un retard à la vaporisation de l'azote dans les pores lors de la désorption. La quantité d'azote adsorbée est plus faible dans le cas d'un xérogel avec DTNB ce qui se traduit par une diminution de surface spécifique et de volume poreux. La distribution en taille des pores n'est que très peu modifiée par le dopage en dehors d'une légère augmentation de la proportion de pores de diamètre supérieur à 50 Å (Figure 2.16.B).

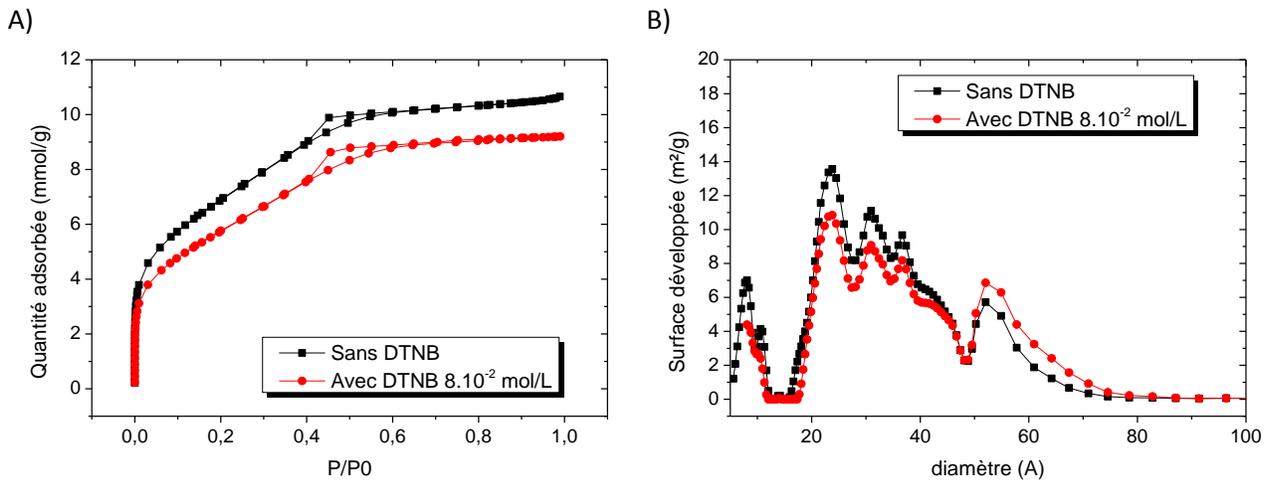


Figure 2.16 : A) Isothermes d'adsorption de diazote à 77K pour des xérogels de formulation TMOS/MeOH/APTES/H<sub>2</sub>O = 1/5/0,03/4 avec et sans DTNB. B) Distributions en taille de pore déduites des isothermes

	Xérogel APTES 0,03	Xérogel APTES 0,03 avec 8.10 <sup>-2</sup> mol/L de DTNB
S <sub>BET</sub> (m <sup>2</sup> /g)	562	471
Volume poreux (cm <sup>3</sup> /g)	0,37	0,32

Tableau 2.2 : Surfaces et volumes poreux développés dans les xérogels contenant ou non du DTNB

## 6. Exposition des capteurs à des VSC générés chimiquement

La réactivité des capteurs a été testée vis-à-vis de deux VSC cibles : le sulfure d'hydrogène (H<sub>2</sub>S) et le méthanthiol (CH<sub>3</sub>SH). Ces composés sont générés par acidification de solutions contenant le sel de dérivés sulfurés (Na<sub>2</sub>S ou CH<sub>3</sub>SNa).

Comme les sulfures formés présentent des constantes de Henry élevées (Tableau 2.3), à l'équilibre, selon la loi de Henry, le nombre total de moles de composés sulfurés est réparti entre la phase gazeuse et la phase liquide. L'Annexe 6.1 détaille les calculs permettant d'accéder à la concentration dans la phase gazeuse (en ppm) à partir de la concentration de sel de dérivés sulfurés dans la phase aqueuse. Le protocole d'exposition y est également décrit.

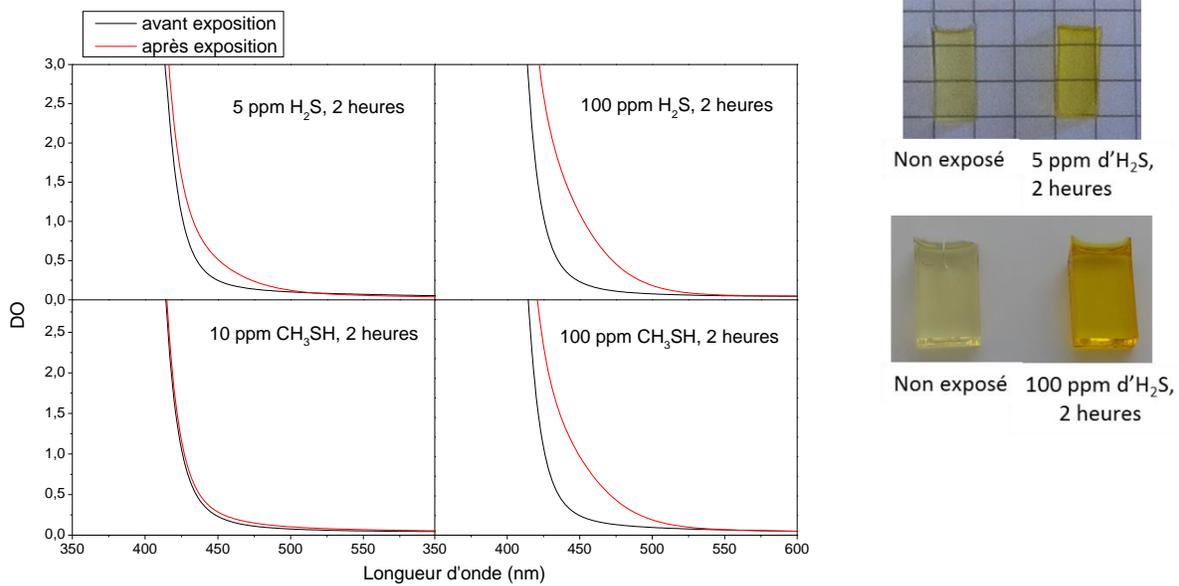
	H <sub>2</sub> S	CH <sub>3</sub> SH
Solubilité dans l'eau	0,11 mol/L [5]	0,48 mol/L[53]
Constante de Henry H <sub>cc</sub>	4,09.10 <sup>-1</sup> [54]	1,23.10 <sup>-1</sup> [54]

Tableau 2.3: Caractéristiques physiques de H<sub>2</sub>S et CH<sub>3</sub>SH.

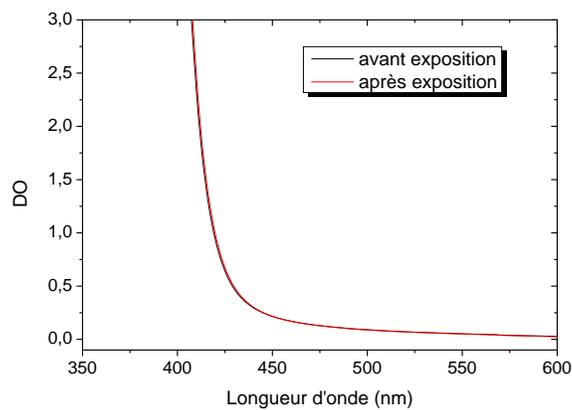
Les capteurs ont été mis en présence de concentrations variant entre 5 ppm et 500 ppm de composés sulfurés. La réaction entre les VSC et la molécule sonde se traduit par un changement de couleur du capteur du jaune vers l'orange, voire le rouge pour les concentrations les plus élevées. En spectroscopie UV-visible, étant donnée la forte absorbance de la molécule sonde à 330 nm, l'apparition

du produit (TNB<sup>2-</sup>) avec son pic à 412 nm se traduit en fait par un décalage de l'absorbance du xérogel vers le rouge.

Pour les capteurs dopés avec  $8.10^{-2}$  mol/L de DTNB, la sensibilité est meilleure pour H<sub>2</sub>S que pour CH<sub>3</sub>SH. En effet, les capteurs changent de couleur lorsqu'ils sont exposés à 5 ppm d'H<sub>2</sub>S pendant deux heures, ce qui n'est pas le cas lorsqu'ils sont exposés à 10 ppm de CH<sub>3</sub>SH (Figure 2.17). Afin de vérifier que c'est bien la génération de VSC qui provoque ce changement de couleur, un témoin a été réalisé en acidifiant une solution ne contenant pas de sel de dérivés sulfurés. Dans ce cas, le capteur ne change pas de couleur (Figure 2.18).



**Figure 2.17: Spectres UV-visibles et photographies de capteurs (dopés avec  $8.10^{-2}$  mol/L de DTNB) après des expositions à différentes concentrations de CSV. En noir : avant l'exposition, en rouge : après l'exposition. Chemin optique : 2 mm.**

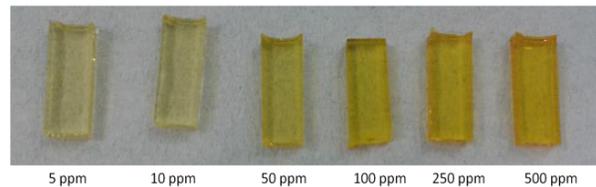
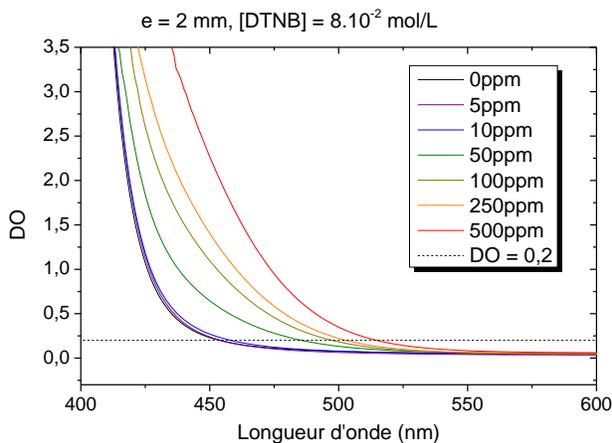


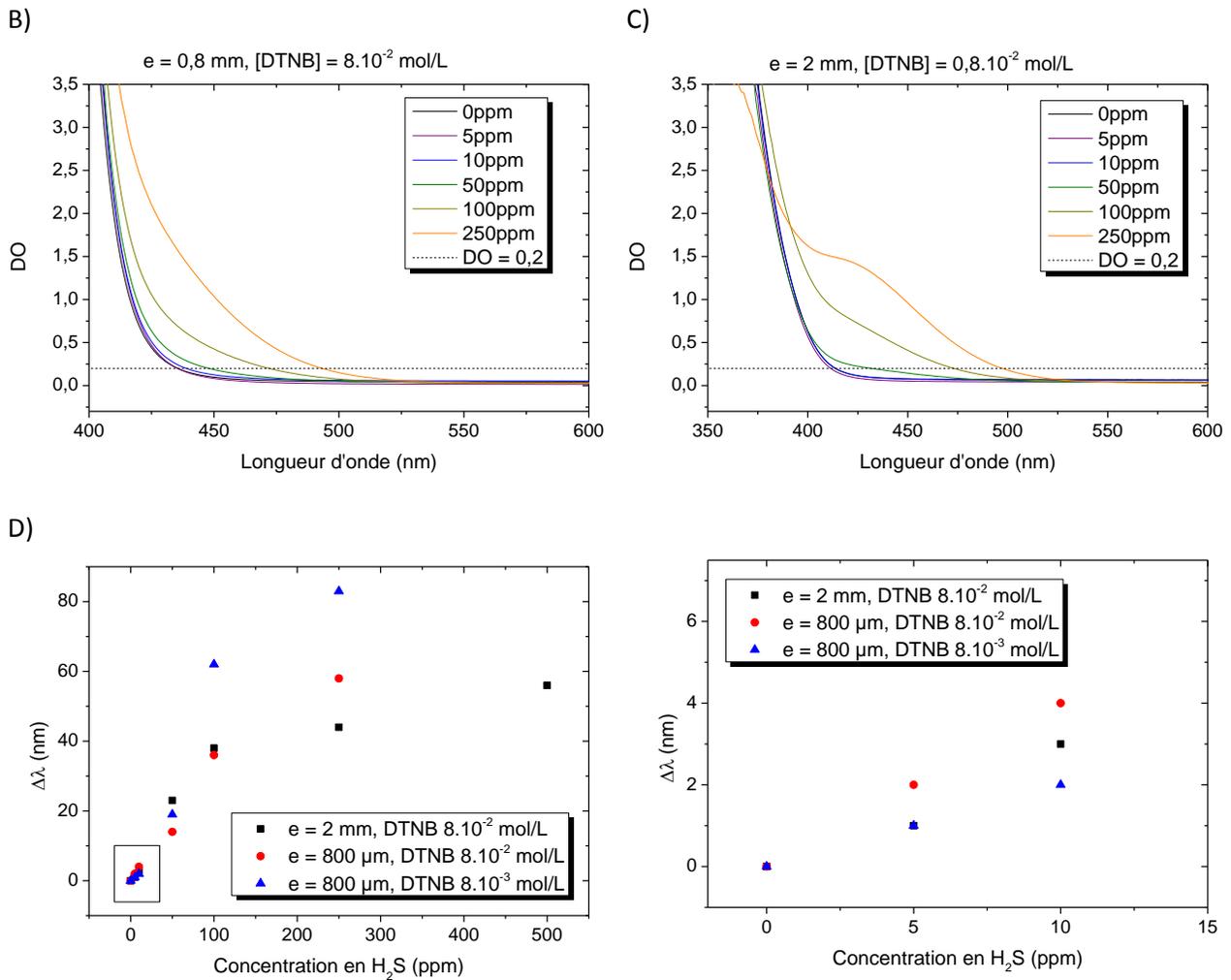
**Figure 2.18: Spectres UV-visible d'un capteur (dopé avec  $8.10^{-2}$  mol/L de DTNB) avant et après une exposition pendant 2 heures à l'atmosphère générée par ajout d'acide chlorhydrique à une solution de soude sans dérivés de sulfures. Chemin optique : 2 mm.**

Pour évaluer l'influence de la concentration en molécule sonde et de l'épaisseur des xérogels, les différents capteurs décrits au paragraphe 5 ont été exposés à différentes concentrations de H<sub>2</sub>S pendant une heure. Dans le cas où les xérogels sont épais (2 mm) et avec un fort dopage en DTNB (8.10<sup>-2</sup> mol/L), l'absorbance du DTNB est importante jusqu'à 420 nm. L'apparition du produit coloré (TNB<sup>2-</sup>) absorbant à 412 nm n'est visible que par un décalage de l'absorption vers les grandes longueurs d'onde (Figure 2.19 A). Lorsque l'épaisseur du xérogel et que la concentration en DTNB diminuent, le pic du DTNB ne dépasse pas les 400 nm, le pic du TNB<sup>2-</sup> forme alors un épaulement à 412 nm (Figure 2.19 C). Il semble plus pertinent d'exprimer l'effet de la formation du TNB<sup>2-</sup> par un décalage du pic d'absorbance vers les longueurs d'onde élevées ( $\Delta\lambda$ , Figure 2.19.D) pour une valeur fixée de densité optique (D.O.). Pour des concentrations en H<sub>2</sub>S inférieures à 100 ppm, on n'observe que très peu de différences de  $\Delta\lambda$  entre les différents capteurs. En revanche, pour des concentrations supérieures à 100 ppm, il est préférable de réduire l'absorbance de la molécule sonde en diminuant l'épaisseur du xérogel et la concentration en molécule sonde à 8.10<sup>-3</sup> mol/L.

La résolution du spectrophotomètre (Cary 300 Varian) est de 1 nm. La variation de longueur d'onde la plus petite considérée comme significative est donc estimée à  $\Delta\lambda = 3$  nm. Avec une durée d'exposition d'une heure, la concentration la plus faible détectée est donc de 10 ppm.

A)





**Figure 2.19: Spectres UV-visible de monolithes avant et après exposition (1 h) à des atmosphères contenant différentes concentrations en H<sub>2</sub>S A) Xérogels dopés avec 8.10<sup>-2</sup> mol/L de DTNB, épaisseur : 2 mm et photographie des monolithes après exposition, B) Xérogels dopés avec 8.10<sup>-2</sup> mol/L de DTNB, épaisseur 800 μm, C) Monolithes dopés avec 0,8.10<sup>-3</sup> mol/L de DTNB, épaisseur 800 μm. D) Décalage en longueur d'onde observés pour chaque type de xérogel ; à droite sur la gamme 0-500 ppm, à gauche : zoom sur les concentrations inférieures à 10 ppm.**

Suite à ces expositions aux sulfures, nous avons remarqué que le TNB<sup>2-</sup> formé n'est pas stable dans les xérogels : après environ trois heures, les xérogels redeviennent jaune pâle. Ce phénomène n'avait pas été observé en phase aqueuse. Une hypothèse avancée est la protonation du TNB<sup>2-</sup> (en TNB<sup>-</sup> ou TNB, absorbants dans l'UV) dans le capteur par l'acide chlorhydrique passé en phase vapeur. En effet, l'acide chlorhydrique est ajouté en large excès et sa concentration en phase aqueuse est d'environ 0,25 mol/L. Avec une constante de Henry de 8.10<sup>-3</sup> sa concentration en phase gaz est estimée à 2.10<sup>-3</sup> mol par litre de gaz soit 48000 ppm. [54] Une partie de l'acide chlorhydrique se trouvant en phase vapeur peut être adsorbée dans le xérogel et protonner le TNB<sup>2-</sup>. Pour vérifier cette hypothèse, il faudrait soit diminuer la concentration en acide chlorhydrique, soit utiliser un acide moins volatil comme l'acide sulfurique (H<sub>cc</sub> = 1,3.10<sup>-11</sup>) ou l'acide oxalique (H<sub>cc</sub> = 2,7.10<sup>-8</sup>). [54]

Nous avons montré qu'il est possible de transposer en xérogel la réaction de rupture du pont disulfure du DTNB par les sulfures volatils. Les xérogels préparés contenant du DTNB sont transparents et absorbent fortement à 330 nm. Même si ce dopage entraîne une absorbance à 412 nm, la détection du produit, le  $TNB^{2-}$ , reste possible. Avec les xérogels préparés, 5 ppm d' $H_2S$  ont pu être détectés en deux heures (Figure 2.17) et 10 ppm en une heure (Figure 2.19.D). Etant donné qu'il s'agit de capteurs cumulatifs, il paraît judicieux d'exprimer la sensibilité sous la forme 10 ppm.h qui tient compte du temps d'exposition. En xérogel comme en phase aqueuse, la réaction entre le DTNB et le méthane-thiol  $CH_3SH$  se fait moins bien qu'avec le sulfure d'hydrogène  $H_2S$ . Cependant, ces expositions ont été réalisées dans des atmosphères simples, ne contenant que les sulfures choisis. En présence d'un mélange de composés volatils générés par des bactéries, il sera possible d'évaluer la sélectivité des xérogels, ainsi que leur réactivité en milieu très humide.

## 7. Mise en œuvre dans la détection de VSC bactériens

Un grand nombre de bactéries, particulièrement en conditions anaérobies, produisent du sulfure d'hydrogène et d'autres VSC. Cela explique pourquoi des travailleurs peuvent être exposés à ces gaz toxiques lors de travaux dans des fosses septiques, des égouts et stations d'épuration.

Pour montrer la faisabilité de la détection de bactéries *via* les CSV émis, une espèce bactérienne non pathogène, *Citrobacter freundii*, sert de modèle. Un montage a été mis en place afin d'optimiser la sensibilité aux VSC et de suivre en continu leur concentration dans les xérogels.

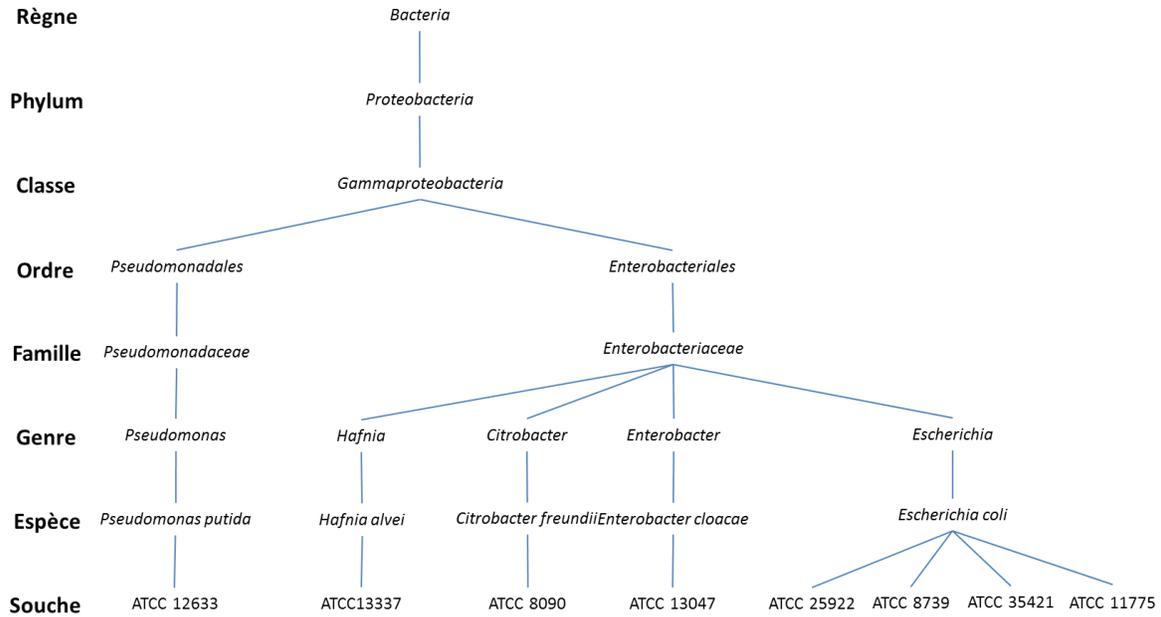
### 7.1 Mise en évidence des VSC produits par *Citrobacter freundii* en conditions anaérobies

Dans le cadre de la détection de VSC d'origine microbienne, les capteurs seront intégrés dans une atmosphère complexe contenant un grand nombre de métabolites volatiles de nature chimique variée (amines, cétones, aldéhydes, alcools, etc.). Ces métabolites volatils pourraient réagir avec la molécule sonde (le DTNB) et donc interférer avec la détection de VSC.

Les capteurs ont été mis en présence de souches bactériennes différentes, dans un milieu riche gélosé auquel a été ajouté du thiosulfate de sodium comme source de soufre. En outre, le milieu est tamponné à pH = 6,1 à l'aide d'acide 2-morpholinoéthanesulfonique (MES). A ce pH, les sulfures comme  $H_2S$  ( $pK_a = 7,04$  et  $12$ ) et  $CH_3SH$  ( $pK_a = 10,4$ ) sont majoritairement sous la forme moléculaire, c'est-à-dire la forme qui est volatile. La composition du milieu nutritif utilisé est détaillée en Annexe 7.2.

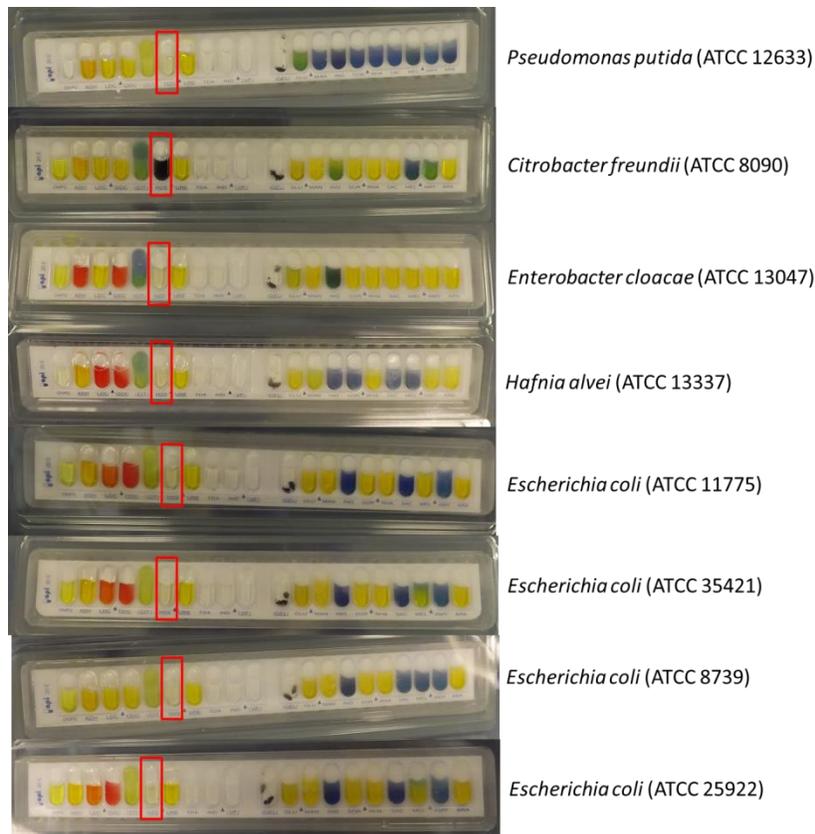
#### 7.1.1 Mise en évidence de la production de $H_2S$ par *Citrobacter freundii*

Les souches utilisées sont listées dans la Figure 2.20. Nous avons choisi des souches très voisines phylogénétiquement, et d'autres bien plus éloignées. Dans la classe des *Gammaproteobacteria*, l'ordre des *Pseudomonales* (souche de *Pseudomonas putida*) et l'ordre des *Enterobacteriales* sont représentés. Dans l'ordre des *Enterobacteriales*, quatre espèces ont été choisies. Seule l'espèce *Escherichia coli* est représentée par quatre souches.



**Figure 2.20 : Souches employées pour la mise en évidence de la production de VSC**

Afin de savoir quelles souches produisent des sulfures, l'activité thiosulfate réductase en conditions anaérobies a été testée sur des galeries API 20E (bioMérieux) : test « H<sub>2</sub>S ». La galerie API 20E comporte 20 cupules (200 µL) contenant des réactifs déshydratés qui sont remplies avec une suspension bactérienne à 0,5 McF de la souche à identifier. Les réactions produites pendant la période d'incubation (18-24 heures à 37°C) se traduisent par des virages colorés. Le test « H<sub>2</sub>S » est réalisé avec du thiosulfate de sodium et du citrate de fer en anaérobiose. Pour cela, la cupule est fermée avec de l'huile de paraffine. Dans le cas où une souche est positive au test « H<sub>2</sub>S », un précipité noir apparaît, signe de la précipitation de Fe<sub>2</sub>S<sub>3</sub>. Parmi les huit souches du modèle, seul *Citrobacter freundii* (ATCC 8090) présente l'activité thiosulfate réductase (Figure 2.21).



**Figure 2.21 : Photographies des galeries API 20E après une nuit d'incubation à 37°C. Le test « H<sub>2</sub>S » est encadré en rouge. Un test positif est caractérisé par un précipité noir, c'est le cas pour la souche *Citrobacter freundii* (ATCC 8090).**

### 7.1.2 Cultures sur milieu gélosé

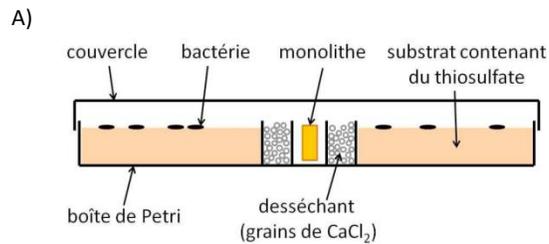
Dans un premier temps, plusieurs souches de bactéries ont été mises en culture sur milieu gélosé en présence d'un capteur dopé avec  $8 \cdot 10^{-2}$  mol/L de DTNB. Grâce au test « H<sub>2</sub>S » des galeries API 20E, nous avons constaté que *Citrobacter freundii* est capable, en conditions anaérobies, de réduire des espèces oxydées du soufre comme le thiosulfate pour former de l'H<sub>2</sub>S, les autres bactéries du modèle n'ont pas cette propriété. L'objectif est de comparer les changements de couleur des capteurs en présence de bactéries générant un mélange d'un grand nombre de métabolites volatils, qu'il contienne des sulfures ou non.

Les tests avec cultures bactériennes sur milieu gélosé ont été effectués sur les 8 souches du modèle, à 37°C, en conditions aérobies et anaérobies (sous N<sub>2</sub>), avec une charge bactérienne initiale d'environ 10<sup>6</sup> ufc par boîte. Le milieu gélosé est tamponné à pH = 6,1 avec du MES (acide 2-morpholinoéthanesulfonique). Cela permet de s'assurer que le sulfure d'hydrogène produit par les bactéries sera sous la forme moléculaire H<sub>2</sub>S ( $pK_a \text{ H}_2\text{S}/\text{HS}^- = 7,04$ ), c'est-à-dire la forme volatile. Les boîtes sont fermées hermétiquement avec du scotch pour confiner les VSC. Le desséchant (CaCl<sub>2</sub>) autour du xérogel permet d'éviter une éventuelle condensation d'eau liquide à la surface du xérogel. Il assure en outre une bonne visibilité du capteur pendant l'expérience en empêchant la condensation d'eau sur la portion de couvercle au-dessus du xérogel.

La Figure 2.22 représente les boîtes de Petri avec leurs capteurs à l'issue de l'incubation (une nuit à 37°C). En conditions aérobies, les capteurs sont jaune-orangé. En conditions anaérobies, seul le capteur exposé à la culture de *Citrobacter freundii* est passé du jaune au rouge vif, signe de la production de VSC. Pour les autres souches comme *Hafnia alvei* par exemple, les capteurs se sont légèrement colorés en orange. Deux hypothèses sont avancées pour l'expliquer :

- Le milieu nutritif (à base de protéines de soja et de caséine, une protéine du lait) contient vraisemblablement des acides aminés soufrés qui peuvent conduire à la formation de H<sub>2</sub>S ou méthane-thiol, par des voies métaboliques autres que la réduction d'un thiosulfate.
- Les bactéries peuvent aussi générer d'autres COV comme par exemple des amines. Ces COV sont aussi capturés dans le xérogel et peuvent augmenter le pH à l'intérieur des pores. Or nous avons remarqué que le pont disulfure du DTNB est rompu en milieu basique.

Comme attendu, le changement de couleur est significativement plus intense pour la souche qui peut réduire le thiosulfate, à savoir *C. freundii* ATCC 8090 en condition anaérobies.



B)

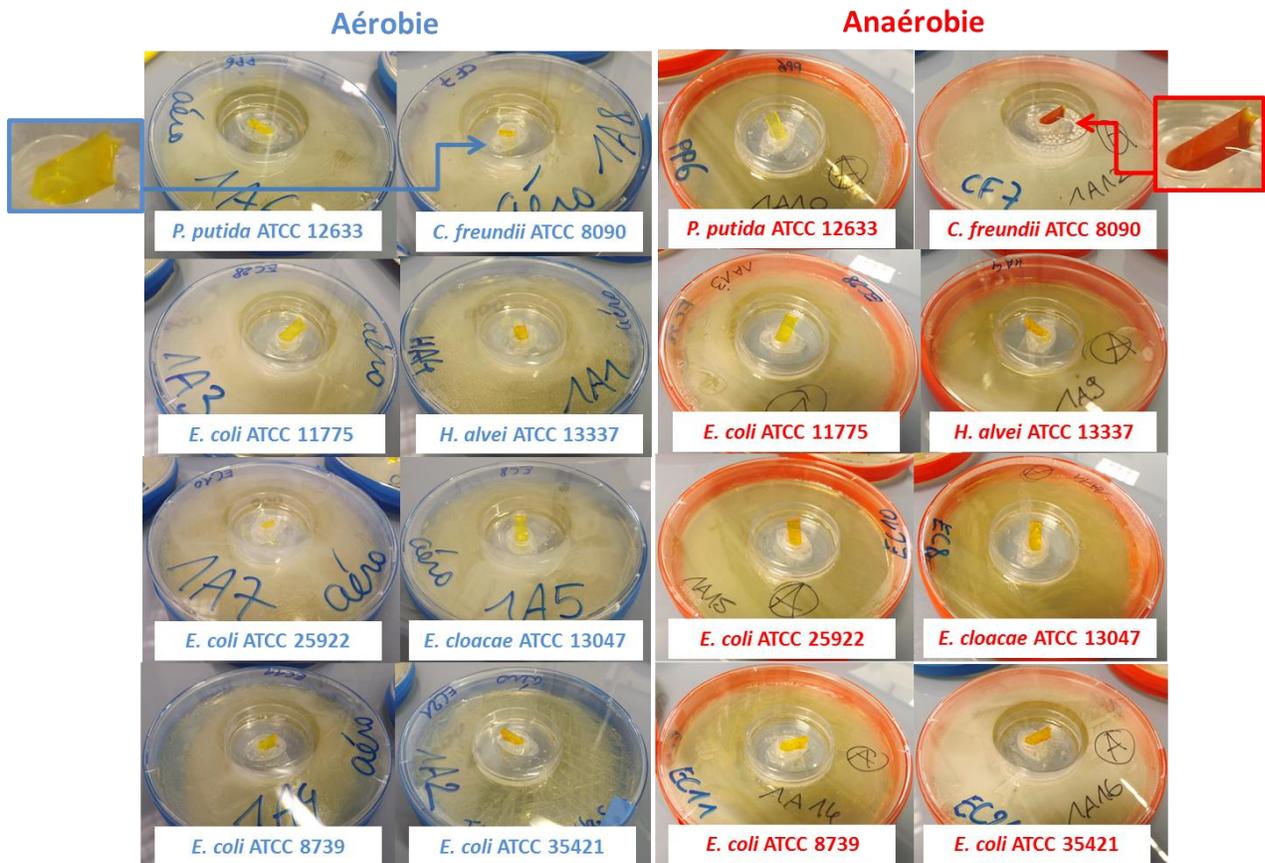


Figure 2.22 : Exposition de capteurs à une culture bactérienne sur milieu gélosé. A) Schéma du dispositif B) Boîtes de Petri avec leurs capteurs à l'issue de l'incubation (une nuit à 37°C). Les 8 boîtes de gauche correspondent aux conditions aérobies, les boîtes de droite à l'anaérobiose. Les deux agrandissements représentent les capteurs insérés dans les boîtes de *C. freundii*.

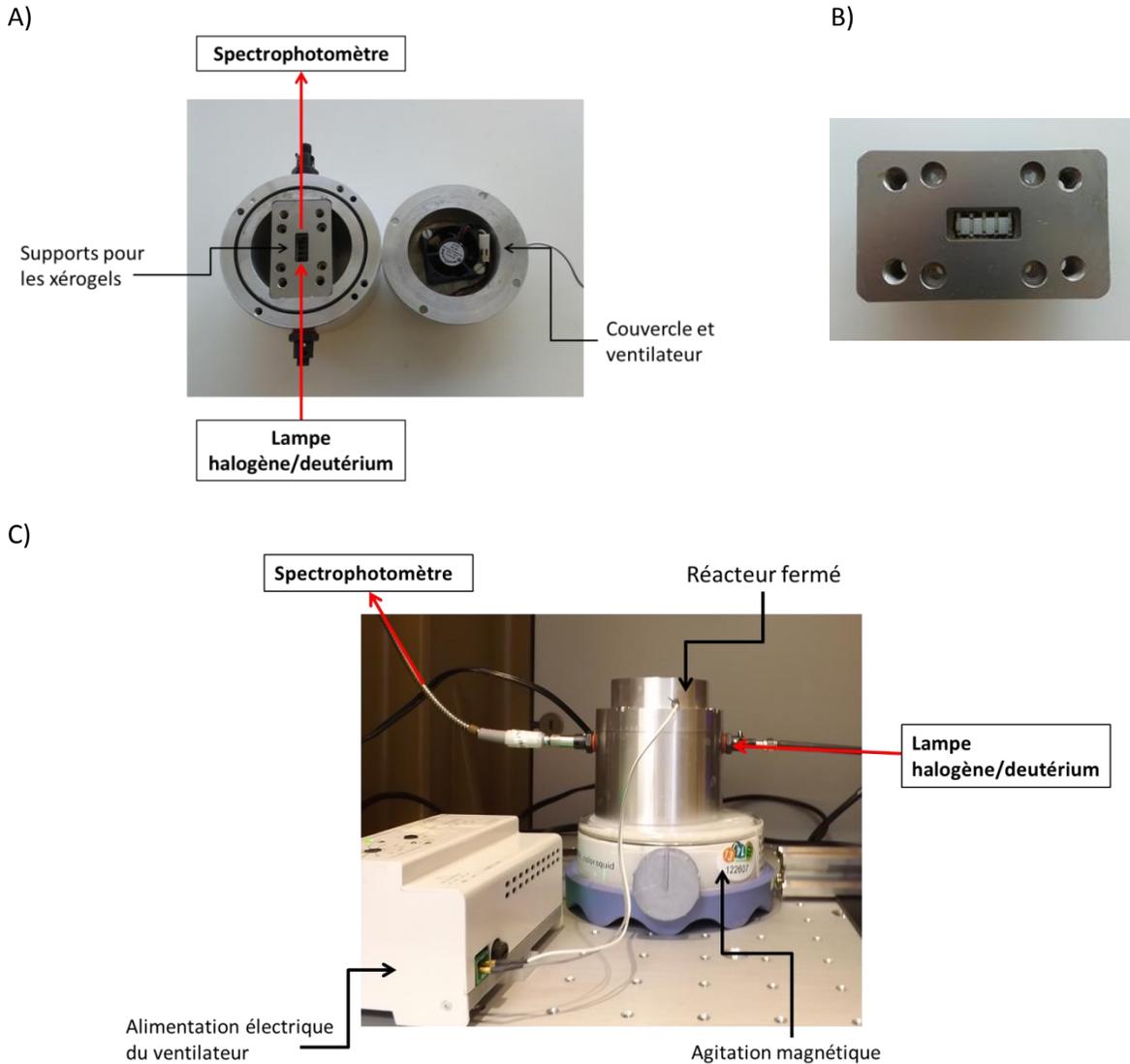
### 7.1.3 Suivi en continu de la production de sulfure d'hydrogène par *Citrobacter freundii*

Dans les expériences décrites ci-dessus, les xérogels sont observés après une nuit d'incubation. Il serait intéressant de savoir, pour une charge bactérienne initiale donnée, en combien de temps les sulfures sont produits et détectés. Pour cela, un réacteur intégrant une culture en milieu liquide et les xérogels a été imaginé.

Dans ce réacteur, une chambre placée au-dessus de la culture en milieu liquide permet d'aligner un ou plusieurs xérogels de 800  $\mu\text{m}$  d'épaisseur. Le fait de multiplier le nombre de xérogels de faible épaisseur a déjà été utilisé dans le cadre de la détection du benzène et du xylène à l'aide de xérogels. [55] Avec cette approche, le nombre d'interfaces gaz/xérogel est augmenté. C'est à ces interfaces que la réaction de rupture du pont disulfure se fait en premier lieu, avant que le gaz ne diffuse vers l'intérieur du xérogel.

Le contenu d'un générateur d'atmosphère anaérobie (GENbag anaer, bioMérieux REF 96124) est placé dans un papier filtre pour assurer l'anaérobiose. Un ventilateur (SUNON

MC30150V2-0000-A99) alimenté avec 5 V permet d'homogénéiser la phase gazeuse. Des fibres optiques équipées de lentilles convergentes ( $f = 5 \text{ mm}$ ) permettent d'éclairer les cinq xérogels avec la lumière d'excitation (lampe halogène/deutérium) et de la collecter après avoir traversé les xérogels. L'accumulation de TNB est suivie à l'aide d'un spectrophotomètre portable (USB 2000 +, Ocean Optics), toutes les quinze minutes, pendant toute la durée de l'incubation à 37°C.



**Figure 2.23 : Photographies du montage permettant le suivi en continu de la production de VSC bactériens. A) Réacteur ouvert contenant le support pour les xérogels et les supports pour fibres optiques et couvercle contenant le ventilateur. B) Support contenant cinq xérogels. C) photographie du montage complet dans l'incubateur à 37°C.**

Dans le réacteur, 50 mL de milieu nutritif liquide tamponné à  $\text{pH} = 6,1$  (MES) et contenant 2 g/L de thiosulfate de sodium (détails en Annexe 7.2) sont inoculés avec une charge bactérienne initiale de  $2.10^6 \text{ ufc/mL}$ .

Cette expérience a été réitérée, dans les mêmes conditions, avec une souche de staphylocoque (*Staphylococcus warneri* ATCC 49454), qui n'est pas capable de réduire le thiosulfate en H<sub>2</sub>S.

Pour suivre la production de sulfure d'hydrogène, un spectre est acquis régulièrement ; et nous relevons la longueur d'onde pour laquelle la DO est de 0,2. Un décalage de cette longueur d'onde vers le rouge indique une rupture du pont disulfure du DTNB et la formation de TNB<sup>2-</sup>. Dans le cas de *Citrobacter freundii*, la production de sulfure d'hydrogène est visible dès 5h30 de culture (Figure 2.24.A). Les xérogels sont passés de jaune clair à orange foncé (Figure 2.24.B). En revanche, dans la culture de *Staphylococcus warneri*, le spectre UV-visible des xérogels est resté identique au cours de l'expérience (Figure 2.24.C) et les xérogels sont restés jaunes pâles (Figure 2.24.D). Un étalement de 0,1 mL de la culture à la fin de l'expérience permet de vérifier qu'il y a bien eu multiplication des *S. warneri* pendant les 10 heures de culture.

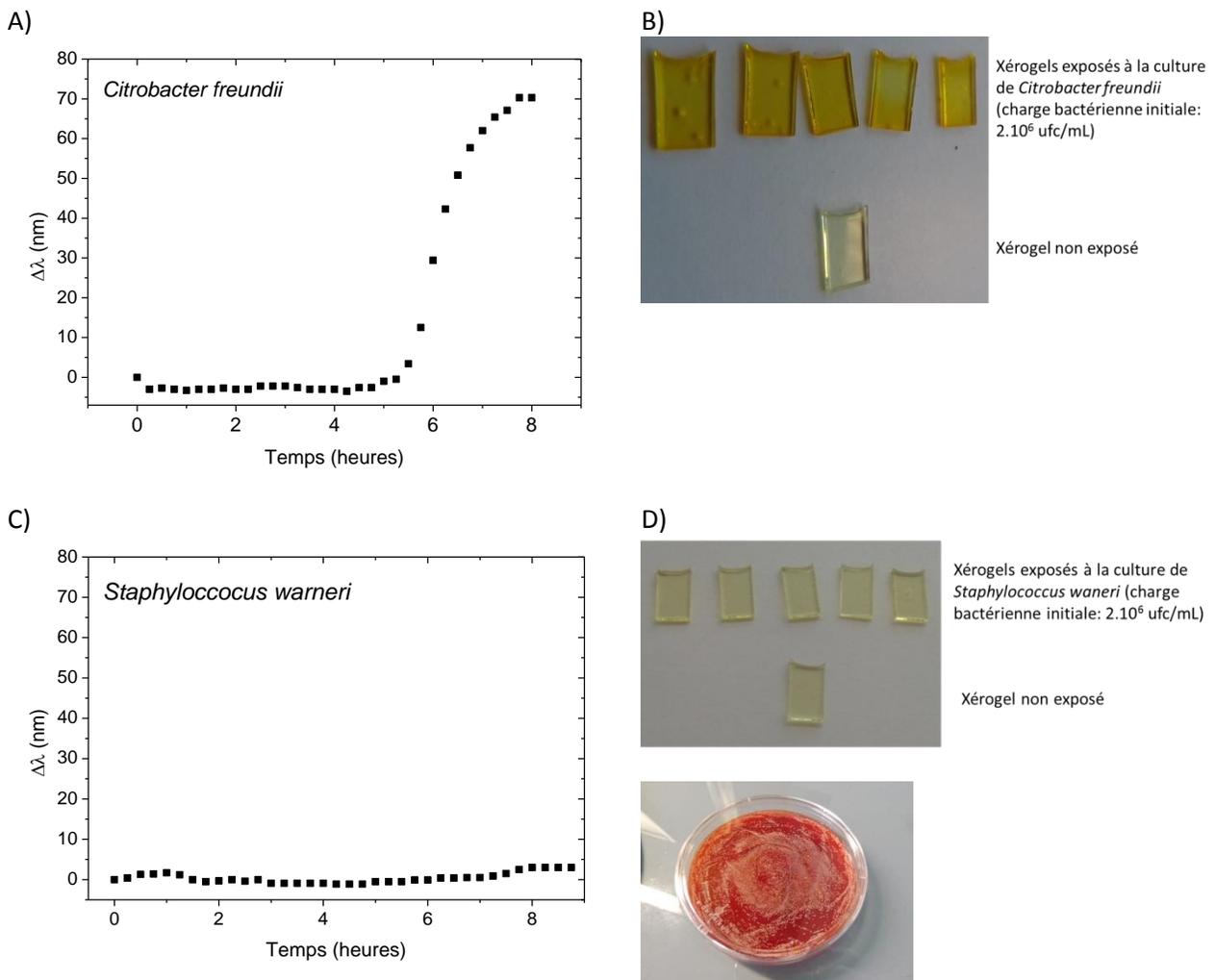


Figure 2.24 : A) Suivi au cours du temps de la production de VSC bactériens par *C. freundii* pour une charge bactérienne initiale de 2.10<sup>6</sup> ufc/mL, B) photographie des xérogels après les 10 heures d'incubation, C) Suivi au cours du temps de la production de VSC bactériens par *S. warneri* pour une charge bactérienne initiale de 2.10<sup>6</sup> ufc/mL. D) Photographie des xérogels après 10 heures d'exposition au-dessus de la culture de *S. warneri* et d'une boîte de Petri inoculée avec 0,1 mL de la culture de *S. warneri* après les 10 heures de culture.

## 7.2 Mise en évidence de *Salmonella* dans des matrices alimentaires

Les expériences précédentes ont montré que les capteurs synthétisés permettent de mettre en évidence une souche capable de produire du sulfure d'hydrogène. C'est aussi le cas de *Salmonella*, une bactérie fréquemment impliquée dans les intoxications alimentaires. Nous avons constaté que la méthode ISO 6579 de 2002 qui décrit le protocole de recherche de *Salmonella* dans les aliments requiert quatre étapes et que tous les échantillons, qu'ils soient positifs ou non à *Salmonella* subissent toutes les étapes de la procédure. Comme la production d'H<sub>2</sub>S est une condition nécessaire mais non suffisante à la détection de *Salmonella*, la surveillance des VSC dans la première étape d'enrichissement non sélectif en sac *Stomacher* permettrait de mettre de côté les sacs où il y a émission de H<sub>2</sub>S. Toutes les cultures négatives à H<sub>2</sub>S pourront être éliminées car elles ne peuvent pas contenir de *Salmonella*, seule la petite fraction de sacs positifs à H<sub>2</sub>S subiront l'enrichissement sélectif et l'isolement.

Trois types d'aliments correspondant à ceux les plus fréquemment contaminés ont été choisis : une mayonnaise à base d'œuf, un camembert à base de lait cru et de la viande de poulet crue. L'objectif est voir s'il est possible de mettre en évidence la présence de salmonelles dans ces échantillons *via* la production de sulfure d'hydrogène dès la première étape d'enrichissement non-sélectif en milieu riche.

	Mayonnaise	Camembert au lait cru	poulet cru
Flore locale ?	non	oui souvent des bactéries lactiques à Gram positif comme <i>Lactobacillus</i> et des coliformes. [56]	oui souvent des entérobactéries.

Tableau 2.4 : Matrices alimentaire testées.

### 7.2.1 Dans une mayonnaise (produit à base d'œufs crus)

La liste des ingrédients de la mayonnaise commerciale est donnée ci-dessous. Elle contient de l'œuf, produit sensible à la contamination à *Salmonella*, ainsi qu'un conservateur le disulfite de potassium.<sup>1</sup> Il s'agit d'un antimicrobien qui agit en bloquant certaines voies enzymatiques. [57]

Une prise d'essai de 25 grammes est diluée dans 250 mL d'eau peptonée tamponnée dans un sac *Stomacher*. Du thiosulfate de sodium est ajouté ( $C_{Na_2S_2O_3} = 43 \text{ mmol/L}$ ), cette concentration correspond à celle introduite dans les géloses XLD. [58]

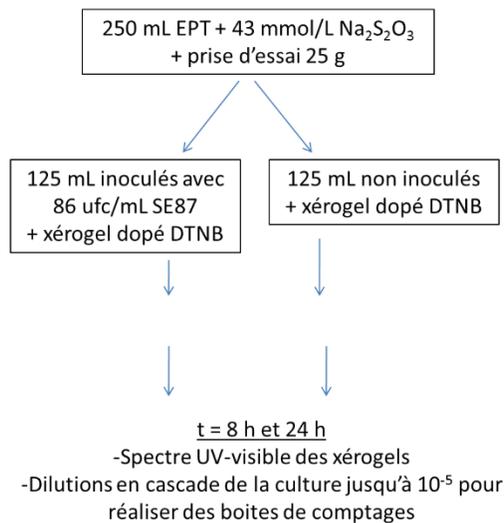
Ce sac est agité vigoureusement afin de décoller les éventuelles bactéries de l'échantillon et d'homogénéiser le milieu de culture à l'aide d'un broyeur Mixwell (AWELL).

Un étalement de 0,1 mL de cette suspension sur TSA (Tryptic Soy Agar, bioMérieux 43-011) et COS (Gélose Columbia + 5% de sang de mouton, bioMérieux 43-041), en conditions aérobies et anaérobies, nous ont permis de constater que la mayonnaise utilisée est stérile.

<sup>1</sup> **Ingrédients de la mayonnaise** : Huile de colza (76%), moutarde de Dijon (7,5%) (eau, graines de moutarde, vinaigre, sel, antioxydant : **disulfite de potassium**, acidifiant : acide citrique), **jaunes d'œufs** de poules élevées en plein air (6,4%), vinaigres (vin blanc, alcool), sel, poivre, sucre, jus de citron concentré.

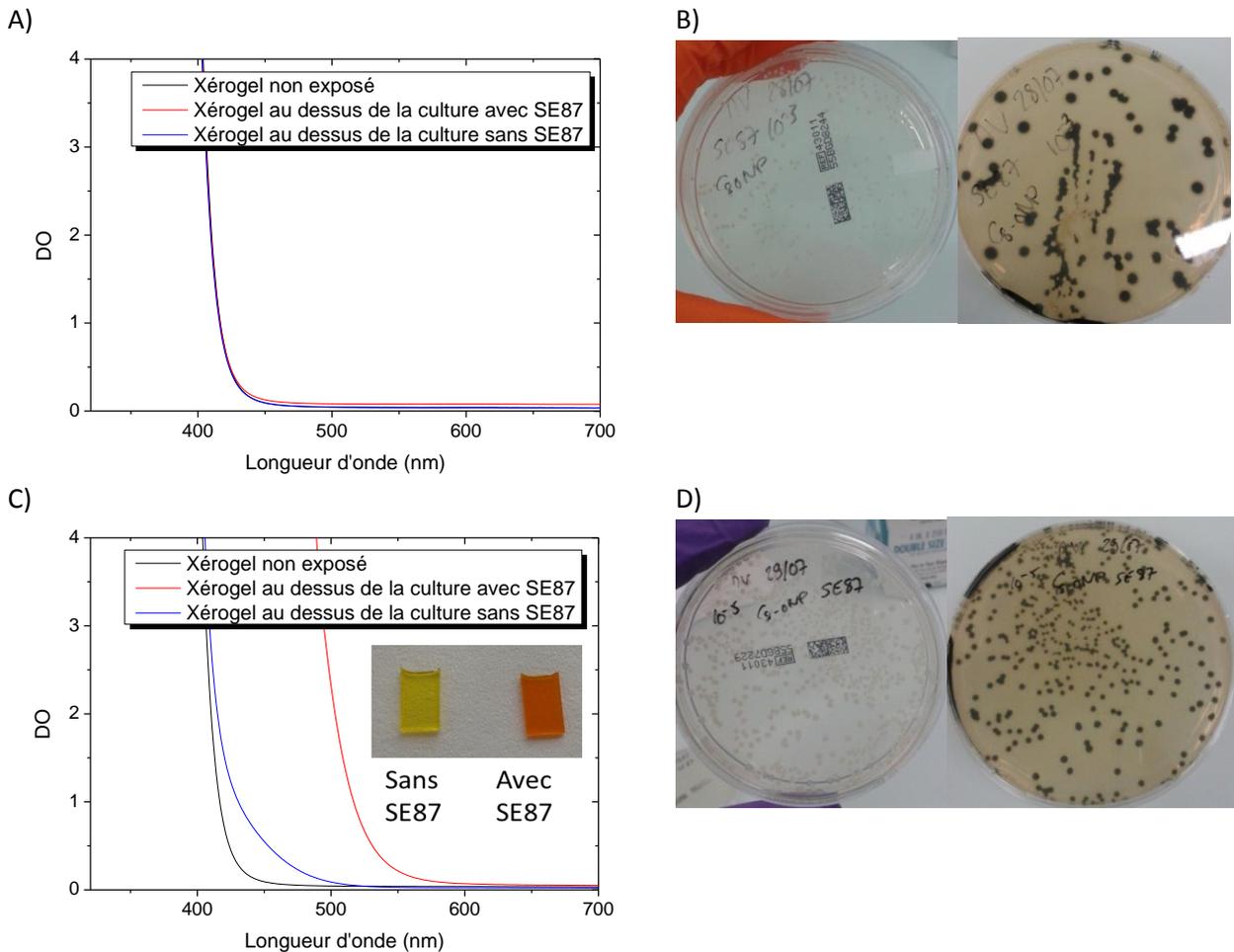
Le contenu du sac est divisé en deux fractions de 125 mL. Dans une des fractions, des Salmonelles sont ajoutées (*Salmonella enterica subsp. enterica* serovar *Enteritidis*, ATCC 13076, SE87, charge bactérienne initiale : 86 ufc/mL) et l'autre non. Un xérogel dopé avec  $8.10^{-2}$  mol/L de DTNB, de 0,8 mm d'épaisseur est placé au-dessus de chacune de ces fractions.

Après 8 heures et 24 heures d'enrichissement, un spectre des xérogels est acquis pour surveiller la production de  $H_2S$  et un échantillon de la culture est prélevé et dilué par décade dans le but d'estimer la charge bactérienne. Chaque décade est étalée à la fois sur des boîtes de TSA (Tryptic Soy Agar, bioMérieux 43-011) afin d'estimer la flore totale, et sur une gélose contenant du thiosulfate de sodium et du chlorure de fer (III). Sur un tel milieu, les salmonelles apparaîtront noires du fait de la production de  $H_2S$  et de la précipitation de  $Fe_2S_3$ .



**Figure 2.25 : Protocole pour la mise en évidence de *Salmonella* dans de la mayonnaise lors de l'étape d'enrichissement non sélectif.**

Après 8 heures de culture, les xérogels n'ont pas changé de couleur, les étalements sur boîtes permettent de constater qu'il y a bien eu croissance des Salmonelles et qu'il s'agit de la seule espèce en présence puisque toutes les colonies apparaissent noires sur la gélose contenant le thiosulfate et le  $FeCl_3$  (Figure 2.26.A et B). Après 24 heures de culture, le xérogel DTNB placé au-dessus de la culture contenant SE87 est devenu rouge vif du fait de l'accumulation d'une grande quantité de  $H_2S$ , alors que celui placé au-dessus de la culture stérile est resté jaune (Figure 2.26.C).



**Figure 2.26 : A) et C) Spectres UV-visibles des xérogels dopés DTNB au-dessus des cultures contenant le thiosulfate de sodium après respectivement 8 et 24 heures. B) Boîtes de comptage réalisées à partir du milieu dilué au 1/1000<sup>e</sup>, après 8 heures de culture. D) Boîtes de comptage réalisées à partir du milieu dilué au 1/10<sup>5</sup>, après 24 heures de cultures.**

A partir des étalements sur gélose, il a été possible de suivre la charge bactérienne au cours des 24 heures de l'enrichissement non sélectif (Tableau 2.5). Cela nous permet de vérifier que le dissulfite de potassium n'entrave pas la croissance des salmonelles.

	Population de Salmonelles
0	86 ufc/mL
8 heures	4.10 <sup>5</sup> ufc/mL
24 heures	6.10 <sup>8</sup> ufc/mL

**Tableau 2.5 : Evolution de la population de Salmonelles au cours des 24 heures d'enrichissement non-sélectif.**

Dans le cas de la mayonnaise, le contrôle de la présence de H<sub>2</sub>S a permis de différencier des échantillons sans et avec Salmonelles (charge initiale : 100 ufc/mL) dès l'étape d'enrichissement non sélectif. La suite décrit la même expérience menée dans des matrices alimentaires qui contiennent une flore locale.

### 7.2.2 Dans de la viande de poulet crue

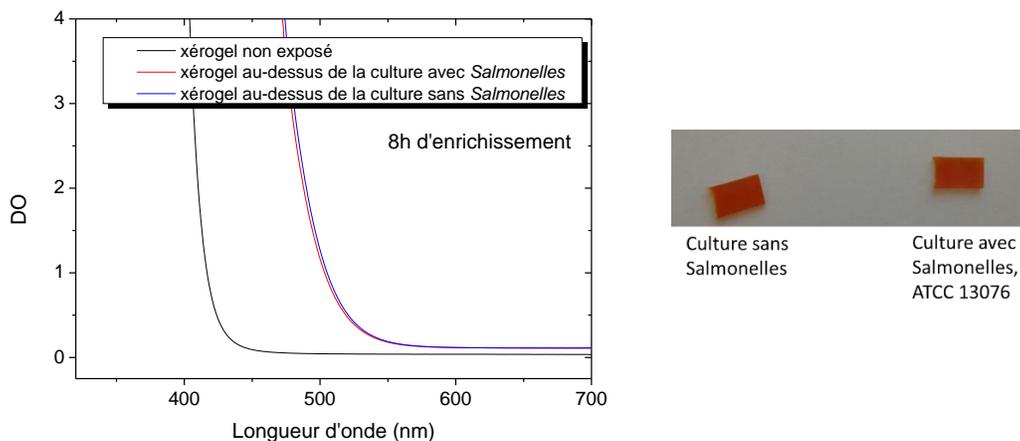
Comme pour la mayonnaise, une prise d'essai de 25 grammes est diluée dans 250 mL d'eau peptonée tamponnée dans un sac *Stomacher* avec du thiosulfate de sodium ( $C_{Na_2S_2O_3} = 6,8 \text{ g/L}$  soit  $43 \text{ mmol/L}$ ). Pour estimer la flore locale, des étalements de la suspension obtenue ont été réalisés sur géloses (TSA, Tryptic Soy Agar, bioMérieux 43-011) en conditions aérobies (Figure 2.27). Au moins 5 souches différentes sont présentes à hauteur d'environ  $2.10^5 \text{ ufc/g}$  de viande.



**Figure 2.27 : Photographie d'une boîte d'isolement (TSA, conditions aérobies) réalisée à partir d'une suspension de viande dans de l'eau peptonée tamponnée, diluée par 10.**

Le protocole appliqué pour l'enrichissement non sélectif est le même que celui décrit en Figure 2.25 : le contenu du sac est divisé en deux fractions de 125 mL, dont une est inoculée avec des *Salmonelles* (*Salmonella enterica subsp. enterica* serovar *Enteritidis*, ATCC 13076, SE87, charge bactérienne initiale :  $66 \text{ ufc/mL}$ ) et l'autre non. Un xérogel dopé avec  $8.10^{-2} \text{ mol/L}$  de DTNB, de 0,8 mm d'épaisseur est placé au-dessus de chacune de ces fractions. Après 8 heures et 24 heures d'enrichissement, un spectre des xérogels est acquis pour surveiller la production de  $H_2S$ .

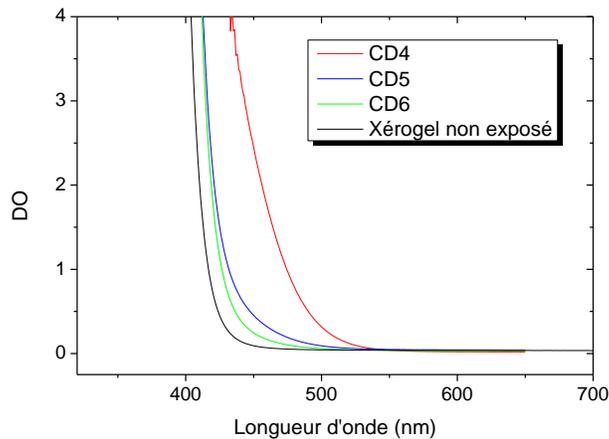
Dès 8 heures d'enrichissement, les xérogels sont devenus orange, signe de l'adsorption de CSV, que ce soit en présence ou non de *Salmonelles* (Figure 2.28).



**Figure 2.28 : Spectres des xérogels dopés DTNB après 8 heures d'enrichissement non sélectif et photographie des xérogels après 24 heures d'enrichissement non sélectif.**

Deux sources de CSV sont envisagées :

- Il est possible que la viande contienne des acides aminés soufrés qui peuvent conduire à la formation de H<sub>2</sub>S ou méthaneéthiol, par des voies métaboliques autres que la réduction d'un thiosulfate.
- Une partie de la flore locale est capable de réduire le thiosulfate en H<sub>2</sub>S. Cela a été vérifié en plaçant des xérogels dopés DTNB au-dessus de cultures de trois souches isolées de la flore locale (nommées CD4, CD5 et CD6) en présence de thiosulfate de sodium (C<sub>Na2S2O3</sub> = 43 mmol/L). Au moins une de ces souches (CD4) est capable de réduire le thiosulfate en H<sub>2</sub>S (Figure 2.29).



**Figure 2.29 : Spectres UV-visible de xérogels dopés DTNB au-dessus de cultures de 3 souches isolées de la flore locale en présence de thiosulfate de sodium pendant 24 heures.**

Pour éviter de faux positifs dus à la production de CSV par la flore locale des matrices, il est nécessaire de réaliser l'enrichissement sélectif qui est la deuxième étape du protocole ISO 6579. Cette étape permet de favoriser la croissance de *Salmonella* par rapport aux autres espèces. Un test H<sub>2</sub>S réalisé au cours de l'enrichissement sélectif ne serait donc pas influencé par la présence de la flore locale.

### 7.2.3 Dans un camembert au lait cru

Comme pour les deux matrices alimentaires précédentes, une prise d'essai de 25 grammes de camembert est diluée dans 250 mL de base nutritive tamponnée à pH 6,1 (composition donnée en Annexe 7.2) dans un sac *Stomacher*. Un camembert peut contenir une flore locale importante et variée dans laquelle on retrouve principalement des bactéries lactiques à Gram positif comme *Lactobacillus* et des coliformes. [56]

Des étalements de la suspension obtenue sur géloses (TSA, Tryptic Soy Agar, bioMérieux 43-011) en conditions aérobies et anaérobies nous ont permis de distinguer trois types de colonies avec des morphologies différentes (Figure 2.30). Ces trois souches (que l'on appellera CD1, CD2 et CD3) ont été isolées. Ces étalements nous permettent d'estimer la quantité de micro-organismes présents avant les étapes d'enrichissement :

- CD1 : 80.10<sup>5</sup> ufc/mL dans le sac, donc 80.10<sup>6</sup> ufc/g dans le camembert ;

- CD2 :  $68.10^5$  ufc/mL dans le sac, donc  $68.10^6$  ufc/g dans le camembert ;
- CD3 : environ  $100.10^5$  ufc/mL dans le sac, donc environ  $100.10^6$  ufc/g dans le camembert.

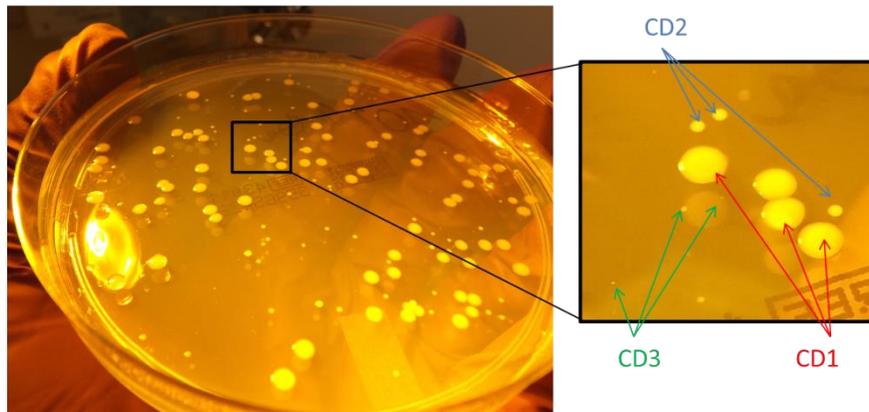


Figure 2.30 : Photographie d'une boîte d'isolement (TSA, conditions anaérobies) réalisée à partir d'une suspension de camembert dans la base nutritive, diluée par  $10^4$ .

Puis, le sac a été incubé pendant une nuit à  $37^\circ\text{C}$  avec agitation. Des capteurs ont été placés dans la partie supérieure du sac afin de voir quels COV interférents peuvent être trouvés en l'absence de *Salmonella*. Après une nuit, le xérogel sans sonde est resté incolore, signe de l'absence de COV absorbants dans le visible. En revanche, le xérogel dopé au DTNB initialement jaune pâle est devenu orange vif, signe de la présence de CSV (Figure 2.31).

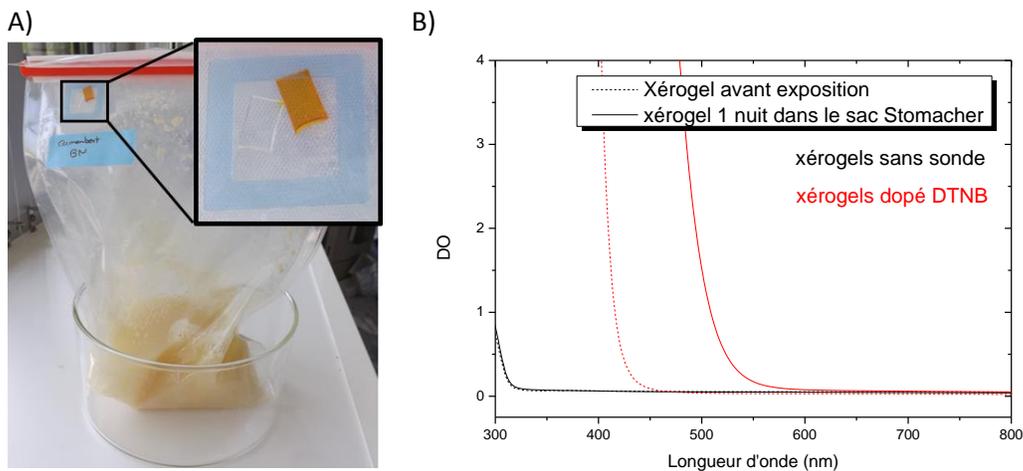


Figure 2.31 : A) Photographie d'un sac *Stomacher* contenant 25 g de camembert dans 250 mL de milieu nutritif. Des xérogels sans sonde et dopé au DTNB ont été placés dans le sac pour suivre la production de COV. B) Spectres UV-visibles des xérogels après une nuit à  $37^\circ\text{C}$  au-dessus de la suspension de camembert.

Deux sources sont envisageables pour les CSV mis en évidence :

- Les CSV peuvent être issus de la dégradation d'acides aminés soufrés par la flore locale.

- Une ou plusieurs des souches présentes dans le camembert pourraient réduire le thiosulfate en  $H_2S$ . Si c'est le cas, le test  $H_2S$  doit être réalisé lors de l'étape d'enrichissement sélectif qui favorise la croissance de *Salmonella* par rapport aux autres micro-organismes.

Pour savoir quelle hypothèse est la bonne, les trois souches ont été isolées puis mises en culture en présence de thiosulfate de sodium ( $C_{Na_2S_2O_3} = 43 \text{ mmol/L}$ ). Après 24 heures, du chlorure de fer est ajouté. Aucun précipité noir n'apparaît ce qui est le signe de l'absence  $H_2S$  dans le milieu. Ces trois souches ne sont donc pas capables de réduire le thiosulfate en  $H_2S$ .

Dans le cas d'une matrice comme le camembert, contenant des composés soufrés, les capteurs de CSV ne sont pas adaptés car ils seront toujours positifs. Pour ces matrices, il faut viser une autre voie enzymatique spécifique de *Salmonelle* comme l'activité enzymatique  $C_8$ -estérase. Cette voie sera explorée dans le chapitre 4.

## Conclusion

Ce chapitre propose l'élaboration d'un capteur poreux dopé avec une molécule sonde pour la détection colorimétrique de Composés Volatils Soufrés (CSV), en particulier H<sub>2</sub>S et le méthane-thiol. La molécule sonde retenue est l'acide 5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoïque) (ou DTNB). En présence de thiols, thiosulfate et sulfures, le pont disulfure central de cette molécule est rompu et l'acide 2-nitro-5-thiobenzoïque (TNB) est libéré. Sous sa forme déprotonnée (TNB<sup>2-</sup>), ce composé absorbe à 412 nm. Dans un premier temps, la réaction en phase aqueuse entre le DTNB et deux composés soufrés, le sulfure d'hydrogène et le méthane-thiol, a été étudiée. Cette étude nous a montré que la cinétique de la réaction à pH=7,4 est suffisamment rapide pour envisager de l'employer dans un xérogel comme réaction de transduction. Nous avons également remarqué que la réaction de détection du CH<sub>3</sub>SNa est moins rapide que celle de Na<sub>2</sub>S, avec un moins bon rendement.

Cette réaction a été transposée dans des xérogels dopés avec du DTNB. Ces capteurs peuvent détecter 5 ppm d'H<sub>2</sub>S en deux heures et 100 ppm de CH<sub>3</sub>SH en deux heures. De plus, ils sont capables de fonctionner dans les conditions difficiles d'un test biologique : avec beaucoup d'humidité et avec de nombreux interférents potentiels. Enfin, on peut remarquer que nos capteurs fonctionnent bien en mode non invasif, puisqu'ils ne perturbent pas la croissance bactérienne.

Dans le domaine de la microbiologie industrielle, de tels capteurs pourraient mettre en évidence la présence de micro-organismes pathogènes producteurs de H<sub>2</sub>S. C'est le cas de *Salmonella*, une bactérie impliquée dans de nombreux cas de toxi-infections alimentaires. Des tests effectués dans trois matrices alimentaires ont permis de mettre en évidence les difficultés rencontrées dans ce type de milieu. La présence d'une flore locale peut être gênante si elle est capable de produire des CSV. Dans ce cas, un test H<sub>2</sub>S réalisé lors de l'enrichissement sélectif qui favorise la croissance de *Salmonella* par rapport aux autres espèces peut être une solution. En revanche, pour les matrices contenant intrinsèquement des composés soufrés comme le camembert, il est nécessaire d'envisager une autre voie enzymatique spécifique de *Salmonella*. Cela sera envisagé dans le chapitre 4. Pour des matrices comme la mayonnaise, ne contenant pas de composés soufrés volatils ni de flore locale capable d'en générer, il est possible de mettre en évidence la présence de *Salmonella* dès l'étape d'enrichissement non-sélectif grâce à la production de sulfure d'hydrogène. Ainsi, des tests biochimiques peuvent être réalisés directement à la fin de cette étape pour déterminer l'espèce et la souche en présence. L'étape d'enrichissement sélectif (~24 heures) peut être supprimée d'où un gain de temps, de main d'œuvre et de consommables.

Le même raisonnement peut être fait pour la détection de l'indole. Ce COV est produit par *E. coli*, une espèce particulièrement recherchée en microbiologie industrielle car elle est souvent impliquée dans les infections alimentaires. Des xérogels dopés au 4-(diméthylamino)cinnamaldehyde (DMACA) permettent une détection colorimétrique (changement de couleur de l'orange au vert). [59]

Les COV émis par les micro-organismes sont nombreux et de natures très différentes. Pour chaque COV d'intérêt, il est nécessaire de chercher une nouvelle molécule sonde, étudier la réaction sonde-cible et sa spécificité, et enfin la transposer en xérogel. Ce processus est long et pour certains COV

relativement inertes, il est quasi-impossible de trouver une molécule sonde spécifique. C'est le cas pour des COV comme le méthane, l'éthanol ou de dioxyde de carbone.

C'est pourquoi la stratégie consistant à détecter des COV exogènes est intéressante. Il s'agira d'introduire un substrat enzymatique pouvant libérer un composé volatil de notre choix, après hydrolyse par une enzyme spécifique de la bactérie ciblée. Dans ce cas, avec un même capteur on peut détecter une grande variété d'espèces. Il devient inutile de mettre au point de nouveaux capteurs pour de nouveaux COV lorsqu'on change d'espèce cible, c'est le substrat enzymatique qui change et non pas les COV émis

## Références bibliographiques

- [1] S. Schulz and J. S. Dickschat, "Bacterial volatiles: the smell of small organisms," *Nat. Prod. Rep.*, vol. 24, no. 4, p. 814, 2007.
- [2] B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and J. D. Watson, *Biologie moléculaire de la cellule, 3ème édition*, Médecine-Sciences, chap 14. .
- [3] L. D. J. Bos, P. J. Sterk, and M. J. Schultz, "Volatile Metabolites of Pathogens: A Systematic Review," *PLoS Pathog.*, vol. 9, no. 5, p. e1003311, May 2013.
- [4] R. Lailler, S. Frémy, C. Oudart, C. Piquet, C. Pires Gomes, C. Danan, S. Granier, F. Moury, and A. Brisabois, "Inventaire des Salmonella d'origine non humaine, réseau Salmonella," *ANSES (Agence Nationale de Sécurité Sanitaire Alimentation, Environnement, Travail)*, 2010.
- [5] N. Bonnard, T. Clavel, M. Falcy, A. Hesbert, D. Jargot, M. Reynier, and O. Schneider, "Fiche toxicologique Sulfure d'hydrogène, FT 32, Edition 2009," *INRS (Institut National de Recherche et de Sécurité)*.
- [6] "US Environmental Protection Agency (US EPA), Toxicological Review of Hydrogen Sulfide, Washington, DC, USA, 2003." .
- [7] H. Xu, J. Wu, C.-H. Chen, L. Zhang, and K.-L. Yang, "Detecting hydrogen sulfide by using transparent polymer with embedded CdSe/CdS quantum dots," *Sens. Actuators B-Chem.*, vol. 143, no. 2, pp. 535–538, Jan. 2010.
- [8] M.-P. Vivarat-Perrin, "Quatorze détecteurs d'hydrogène sulfuré passés au banc d'essai," *Mesure 815*, pp. 30–33, 2009.
- [9] "www.chromatec.com." consulté le 25/04/2015.
- [10] S. K. Pandey, K.-H. Kim, and K.-T. Tang, "A review of sensor-based methods for monitoring hydrogen sulfide," *TrAC Trends Anal. Chem.*, vol. 32, pp. 87–99, Feb. 2012.
- [11] G. F. Fine, L. M. Cavanagh, A. Afonja, and R. Binions, "Metal Oxide Semi-Conductor Gas Sensors in Environmental Monitoring," *Sensors*, vol. 10, no. 6, pp. 5469–5502, Jun. 2010.
- [12] "https://simtronics.eu/fr/detecteurs-de-gaz-toxiques/multitox-dg-tt7-s." .
- [13] "www.alpha-mos.com/." consulté le 27/05/2015.
- [14] P. Jeroschewski, C. Steuckart, and M. Kuhl, "An amperometric microsensor for the determination of H<sub>2</sub>S in aquatic environments," *Anal. Chem.*, vol. 68, no. 24, pp. 4351–4357, Dec. 1996.
- [15] "www.cairpol.com." consulté le 22/04/2015.
- [16] "http://www.alphasense.com/." consulté le 22/04/2015.
- [17] "http://www.lazarlab.com/home.html." consulté le 22/04/2015.
- [18] M. Shahriari and J. Ding, "Active Silica-Gel Films for Hydrogen-Sulfide Optical Sensor Application," *Opt. Lett.*, vol. 19, no. 14, pp. 1085–1087, Jul. 1994.
- [19] M. M. F. Choi, "Fluorimetric optode membrane for sulfide detection," *Analyst*, vol. 123, no. 7, pp. 1631–1634, Jul. 1998.
- [20] M. M. F. Choi and P. Hawkins, "Development of an optical hydrogen sulphide sensor," *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 90, no. 1–3, pp. 211–215, Apr. 2003.
- [21] J. Rodriguez-Fernandez, J. M. Costa, R. Pereiro, and A. Sanz-Medel, "Simple detector for oral malodour based on spectrofluorimetric measurements of hydrogen sulphide in mouth air," *Anal. Chim. Acta*, vol. 398, no. 1, pp. 23–31, Oct. 1999.
- [22] D. Natusch, J. Sewell, and R. Tanner, "Determination of Hydrogen-Sulfide in Air - Assessment of Impregnated Paper Tape Methods," *Anal. Chem.*, vol. 46, no. 3, pp. 410–415, 1974.
- [23] "Sigma Aldrich, Lead acetate paper, catalog number 37104." .
- [24] E. T. Kato, C. M. Yoshida, A. B. Reis, I. S. Melo, and T. T. Franco, "Fast detection of hydrogen sulfide using a biodegradable colorimetric indicator system," *Polym. Int.*, vol. 60, no. 6, pp. 951–956, Jun. 2011.

- [25] S. J. Hawkins, N. M. Ratcliffe, and A. Sagastizabal, "The use of thin silver films for the detection of low concentrations of hydrogen sulphide," *Anal. Chim. Acta*, vol. 359, no. 1–2, pp. 125–132, Feb. 1998.
- [26] J. Rodríguez-Fernández, R. Pereiro, and A. Sanz-Medel, "Optical fibre sensor for hydrogen sulphide monitoring in mouth air," *Anal. Chim. Acta*, vol. 471, no. 1, pp. 13–23, Oct. 2002.
- [27] M. Mousavi and M. Shamsipur, "Spectrophotometric Determination of Trace Amounts of Sulfide Ion Based," *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, vol. 65, no. 10, pp. 2770–2772, Oct. 1992.
- [28] A. Safavi, A. Rahmani, and V. N. Hosseini, "Kinetic-spectrophotometric determination of sulfide by its reaction with resazurin," *Fresenius J. Anal. Chem.*, vol. 354, no. 4, pp. 502–504, Feb. 1996.
- [29] K. J. Wallace, S. R. Cordero, C. P. Tan, V. M. Lynch, and E. V. Anslyn, "A colorimetric response to hydrogen sulfide," *Sens. Actuators B-Chem.*, vol. 120, no. 2, pp. 362–367, Jan. 2007.
- [30] J. Rodríguez-Fernández, R. López-Fernández, R. Pereiro, M. Menéndez, J. M. Tejerina, A. Sicilia, and A. Sanz-Medel, "A sorbent tube for oral malodour monitoring," *Talanta*, vol. 62, no. 2, pp. 421–426, Feb. 2004.
- [31] J. M. Davidson, Z. Pikramenou, A. Ponce, and R. E. P. Winpenny, "Measurement of Parts per Million Level Gaseous Concentration of Hydrogen Sulfide by Ultraviolet Spectroscopy using 1,1,1,5,5,5-Hexafluoropentan-2,4-dione as a Derivative by Reaction of Cu(hfac)(1,5-Cyclooctadiene)," *Anal. Chem.*, vol. 81, no. 9, pp. 3669–3675, May 2009.
- [32] A. Pichard, M. Bisson, N. Houex, G. Gay, G. Lacroix, J. Lefevre, H. Magaud, V. Migne, A. Morin, and S. Tissot, "Cuivre et ses dérivés," *Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques, INERIS*, 03-Nov-2005.
- [33] E. Fischer, vol. 16, p. 2234, 1883.
- [34] V. Kuban, P. K. Dasgupta, and J. N. Marx, "Nitroprusside and methylene blue methods for silicone membrane differentiated flow injection determination of sulfide in water and wastewater," *Anal. Chem.*, vol. 64, no. 1, pp. 36–43, Jan. 1992.
- [35] L.-H. Guillemot, "Capteurs chimiques à base de matrices synthétisées par voie sol-gel et à transduction optique pour la détection de composés organiques volatils microbiens (mCOV)," Thèse de doctorat, Université Paris-Sud, soutenue le 19/10/2012.
- [36] M. A. Spaziani, J. L. Davis, M. Tinani, and M. K. Carroll, "On-line determination of sulfide by the 'methylene blue method' with diode-laser-based fluorescence detection," *Analyst*, vol. 122, no. 12, pp. 1555–1557, Dec. 1997.
- [37] N. S. Lawrence, J. Davis, L. Jiang, T. G. J. Jones, S. N. Davis, and R. G. Compton, "Selective determination of thiols: a novel electroanalytical approach," *Analyst*, vol. 125, no. 4, pp. 661–663, Jan. 2000.
- [38] P. Eyer, F. Worek, D. Kiderlen, G. Sinko, A. Stuglin, V. Simeon-Rudolf, and E. Reiner, "Molar absorption coefficients for the reduced Ellman reagent: reassessment," *Anal. Biochem.*, vol. 312, no. 2, pp. 224–227, Jan. 2003.
- [39] P. W. Riddles, R. L. Blakeley, and B. Zerner, "Ellman's reagent: 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)—a reexamination," *Anal. Biochem.*, vol. 94, no. 1, pp. 75–81, Apr. 1979.
- [40] D. Gergel' and A. I. Cederbaum, "Interaction of Nitric Oxide with 2-Thio-5-nitrobenzoic Acid: Implications for the Determination of Free Sulfhydryl Groups by Ellman's Reagent," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 347, no. 2, pp. 282–288, Nov. 1997.
- [41] A. Pastore, F. Piemonte, M. Locatelli, A. L. Russo, L. M. Gaeta, G. Tozzi, and G. Federici, "Determination of Blood Total, Reduced, and Oxidized Glutathione in Pediatric Subjects," *Clin. Chem.*, vol. 47, no. 8, pp. 1467–1469, Aug. 2001.
- [42] I. Rahman, A. Kode, and S. K. Biswas, "Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method," *Nat. Protoc.*, vol. 1, no. 6, pp. 3159–3165, Jan. 2007.

- [43] "Abnova, Glutathione assay kit, Catalog KA0797, Version 4." .
- [44] "Sigma Aldrich, Glutathione Assay Kit, catalog number CS0260." .
- [45] G. L. Ellman, K. D. Courtney, V. Andres jr., and R. M. Featherstone, "A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 7, no. 2, pp. 88–95, Jul. 1961.
- [46] F. Worek, U. Mast, D. Kiderlen, C. Diepold, and P. Eyer, "Improved determination of acetylcholinesterase activity in human whole blood," *Clin. Chim. Acta*, vol. 288, no. 1–2, pp. 73–90, Oct. 1999.
- [47] A. Komersova, K. Komers, and A. Cegan, "New findings about Ellman's method to determine cholinesterase activity," *Z. Naturforschung C- J. Biosci.*, vol. 62, no. 1–2, pp. 150–154, Feb. 2007.
- [48] S. M. Z. Hossain, R. E. Luckham, A. M. Smith, J. M. Lebert, L. M. Davies, R. H. Pelton, C. D. M. Filipe, and J. D. Brennan, "Development of a Bioactive Paper Sensor for Detection of Neurotoxins Using Piezoelectric Inkjet Printing of Sol–Gel-Derived Bioinks," *Anal. Chem.*, vol. 81, no. 13, pp. 5474–5483, Jul. 2009.
- [49] R. Humphrey, M. Ward, and W. Hinze, "Spectrophotometric Determination of Sulfite with 4,4'-Dithiodipyridine and 5,5'-Dithiobis-(2-Nitrobenzoic Acid)," *Anal. Chem.*, vol. 42, no. 7, p. 698–8, 1970.
- [50] Q. Lei and W. L. Boatright, "Development of a New Methanethiol Quantification Method Using Ethanethiol as an Internal Standard," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 49, no. 8, pp. 3567–3572, Aug. 2001.
- [51] E. Galardon, A. Tomas, P. Roussel, and I. Artaud, "New fluorescent zinc complexes: towards specific sensors for hydrogen sulfide in solution," *Dalton Trans.*, no. 42, p. 9126, 2009.
- [52] W. Brown, C. Foote, B. Iverson, and E. Anslyn, in *Organic chemistry*, Cengage Learning., 2011, pp. 170–171.
- [53] "Fiche toxicologie méthaneethiol, éthaneethiol et 1-butanethiol, FT 190, Edition 2007," *INRS (Institut National de Recherche et de Sécurité)*.
- [54] R. Sander, "Compilation of Henry's law constants, version 3.99," *Atmospheric Chem. Phys. Discuss.*, vol. 14, no. 21, pp. 29615–30521, Nov. 2014.
- [55] J. Hue, M. Dupoy, T. Bordy, R. Rousier, S. Vignoud, B. Schaerer, T.-H. Tran-Thi, C. Rivron, L. Mughferli, and P. Karpe, "Benzene and xylene detection by absorbance in the range of 10–100 ppb application: Quality of indoor air," *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 189, pp. 194–198, Dec. 2013.
- [56] J. Richard and H. Zadi, "Inventaire de la flore bactérienne dominante des Camemberts fabriqués avec du lait cru," *Le lait*, vol. 63, pp. 25–42, 1983.
- [57] B. De Reynal and J. Multon, *Additifs et auxiliaires de fabrication dans les industries agroalimentaires*, Lavoisier, chap 7. 2009.
- [58] "Mode d'emploi\_milieux en boites de petri prêts à l'emploi, BD XLD Agar." Becton Dickinson, 2013.
- [59] S. Crunaire, P. R. Marcoux, L.-H. Guillemot, K.-Q. Ngo, F. Mallard, J.-P. Moy, and T.-H. Tran-Thi, "Discriminating Bacteria With Functionalised Nanoporous Xerogels," *Procedia Chem.*, vol. 6, pp. 125–131, 2012.



## Chapitre 3. Détection d'une amine aromatique volatile exogène : la $\beta$ - naphthylamine

---

<b>CHAPITRE 3. DETECTION D'UNE AMINE AROMATIQUE VOLATILE EXOGENE : LA <math>\beta</math>-NAPHTHYLAMINE .....</b>	<b>81</b>
1. LES COV EXOGENES : GENERALITES .....	83
2. CHOIX DE L'AMINE VOLATILE EXOGENE : LA $\beta$ -NAPHTHYLAMINE .....	86
3. DETECTION DE LA $\beta$ -NAPHTHYLAMINE EN ABSORBANCE APRES REACTION AVEC UNE MOLECULE SONDE.....	86
3.1 <i>Etude de la réaction sonde-cible en phase liquide</i> .....	86
3.1.1 Choix du pH .....	87
3.1.2 Caractérisation du produit azo formé.....	90
3.1.3 Evaluation d'interférents potentiels .....	92
3.2 <i>Mise en évidence de l'activité chez plusieurs souches</i> .....	94
3.3 <i>Synthèse et caractérisation de xérogels dopés au DMACA</i> .....	96
3.3.1 Synthèse des xérogels.....	96
3.3.2 Exposition des xérogels à la $\beta$ -naphthylamine.....	96
4. DETECTION DE LA $\beta$ -NAPHTHYLAMINE EN FLUORESCENCE.....	98
4.1 <i>Propriétés de fluorescence</i> .....	98
4.2 <i>Mise en évidence de la <math>\beta</math>-naphthylamine dans des xérogels par fluorescence</i> .....	99
CONCLUSION .....	101
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	103

## 1. Les COV exogènes : généralités

La détection d'une espèce particulière par le biais de ses métabolites volatils nécessite d'aller chercher non pas un mais plusieurs COV endogènes. C'est la détection combinée de ces biomarqueurs volatils qui peut assurer la spécificité. Dès lors, si le COV n'a pas de propriétés optiques intrinsèques, il faut être capable de trouver autant de molécules sondes que de nouveaux COV à détecter, ce qui peut se révéler fastidieux, voire impossible lorsque le COV en question est peu réactif. L'utilisation de substrats osmogènes peut se révéler une alternative avantageuse. Cela consiste à employer des voies enzymatiques des bactéries à détecter pour former des COV choisis. Cette méthode est assez versatile :

- Soit les substrats ciblent les voies enzymatiques les plus courantes et conduisent tous au même COV. Dans ce cas, l'utilisation d'un seul capteur assure une simple fonction de détection.
- Soit les substrats, chacun ciblant une voie enzymatique spécifique, libèrent des COV différents. Si le nombre de substrats et de capteurs est suffisant, une identification est possible.

Le choix des substrats se fait en fonction de l'enzyme ciblée chez la bactérie ou le groupe que l'on souhaite mettre en évidence. Les cibles et les substrats employés sont détaillés ci-dessous.

- **Activité enzymatique L-alanine aminopeptidase.** La coloration de Gram est une technique qui permet de classer les bactéries en deux catégories en fonction des propriétés de leur paroi (Annexe 1.3). Des études ont révélé que l'activité enzymatique L-alanine aminopeptidase se trouverait plus particulièrement chez les **Gram-**. [1] [2] Un tel test permettrait de déterminer précocement le caractère Gram+/Gram- dans une culture avant même de réaliser une coloration de Gram.

L'enzyme L-alanine aminopeptidase clive des substrats composés d'un acide aminé relié à un COV par une liaison peptidique. Le COV libéré doit donc contenir une fonction amine, c'est le cas de la  $\beta$ -naphthylamine qui sera employée dans ce chapitre pour mettre en évidence l'activité L-alanine aminopeptidase des Gram-.

- **Activité enzymatique  $\alpha$ -glucosidase.** Cette voie enzymatique est par exemple utilisée dans les milieux chromogènes ChromID SA/MRSA de bioMérieux, [3][4] pour le dépistage des patients porteurs de *Staphylococcus aureus*. Cette bactérie est responsable d'intoxications alimentaires, d'infections cutanées et ostéoarticulaires, ainsi que d'endocardites infectieuses et de septicémies. La progression de souches de *S. aureus* résistantes aux antibiotiques constitue un problème majeur de santé publique.
- **Activité enzymatique  $\beta$ -glucuronidase.** Une activité  $\beta$ -glucuronidase est un indicateur de la présence de *Escherichia coli*. [5] Elle est mise à profit dans les milieux gélosés chromogènes Tryptone Bile X-glucuronide (TBX) et les automates TEMPO EC (bioMérieux) pour le dénombrement en matrice alimentaire des *Escherichia coli*. [6][7] Cette bactérie est responsable de près de 21% des bactériémies, [8] elle est aussi souvent mise en cause dans des cas

d'intoxications alimentaires. Certains sérovars virulents comme O157 :H7 sont particulièrement surveillés.

- **Salmonella.** Les sérovars *Enteritidis* et *Typhimurium* sont majoritairement mis en cause dans des cas d'intoxications alimentaires. Les aliments les plus touchés sont les viandes (47,2%), les produits laitiers (9,7%), les charcuteries (8,8%) et les produits à base d'œufs (3,8%). [9] Elle est la seule bactérie de la famille des *Enterobacteriaceae* capable de cliver des esters avec une chaîne octanoate. Cette activité est mise à profit dans les géloses CHROMagar (Becton Dickinson) et RAPID'*Salmonella* (Bio-Rad). [10][11]

La mise en évidence de ces trois activités enzymatiques requiert des substrats composés de sucres (activités  $\alpha$ -glucosidase et  $\beta$ -glucuronidase) ou d'acides gras (activité  $C_8$ -estérase) couplés à un COV contenant un hydroxyle (-OH). Les dérivés nitrophénoliques (2-nitrophénol et 4-nitrophénol) seront employés. Cette partie sera traitée dans le chapitre 4.

Pour chaque COV exogène étudié, la démarche suivie est la suivante :

- Tout d'abord, on étudie en phase liquide les propriétés optiques et physico-chimiques du COV ; à savoir absorbance UV-visible, fluorescence et son éventuelle réactivité avec une molécule sonde.
- Puis, des xérogels sont synthétisés, avec ou sans molécule sonde, en imitant au maximum les conditions optimales de détection observées en phase liquide. Ces xérogels sont caractérisés en les exposant à un COV généré chimiquement.
- Si la détection du COV est satisfaisante en matrice simple (*e.g.* solution aqueuse tamponnée), il est introduit dans une matrice liquide complexe (*e.g.* lait, sang, *etc.*) pour évaluer l'impact des propriétés physico-chimiques de cette matrice sur la concentration du COV en phase gazeuse.
- Enfin, les capteurs développés sont mis en présence du COV généré par l'activité enzymatique de bactéries.

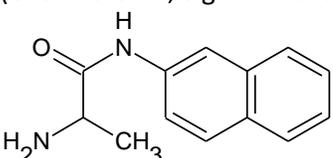
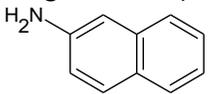
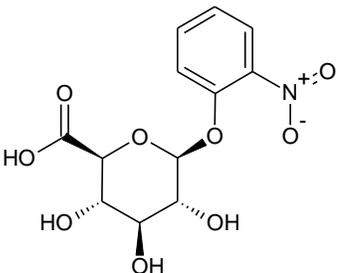
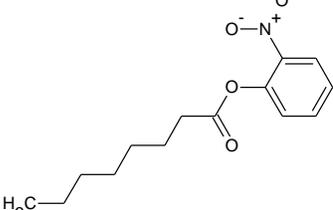
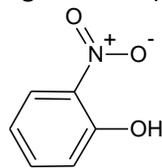
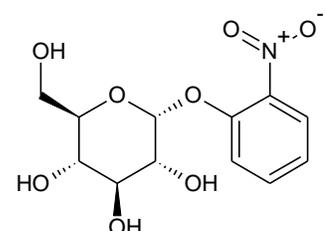
Intérêt diagnostique (enzyme spécifique)	Substrat osmogènes	COV exogène	Détection optique
Différentiation Gram+/Gram- (L-alanine-aminopeptidase)	L-alanine- $\beta$ -naphthylamide (CAS 720-82-1, Sigma A2628) 	$\beta$ -naphthylamine (CAS 91-59-8, Sigma N8381) 	Absorbance (avec une molécule sonde : DMACA) Fluorescence (sans molécule sonde) (Chapitre 3)
<i>Escherichia coli</i> ( $\beta$ -glucuronidase)	2-nitrophényl- $\beta$ -D-glucuronide (CAS 137629-36-8, Carbosynth EN04827) 		
<i>Salmonella</i> ( $C_8$ -estérase)	2-nitrophényl-caprylate (CAS 104809-25-8, Carbosynth EN15363) 	2-nitrophénol (CAS 88-75-5, Sigma 33444) 	Absorbance sans molécule sonde (Chapitre 4)
<i>Staphylococcus aureus</i> ( $\alpha$ -glucosidase)	2-nitrophényl- $\alpha$ -D-glucopyranoside (CAS 56193-44-3, Carbosynth EN43851) 		

Tableau 3.1 : Substrats osmogènes et COV libérés utilisés dans les chapitres 3 et 4.

## 2. Choix de l'amine volatile exogène : la $\beta$ -naphthylamine

La coloration de Gram est historiquement un des premiers critères de classement. Elle classe les procaryotes en deux groupes en fonction des propriétés de leur paroi cellulaire (Annexe 1.3). C'est un des tout premiers tests réalisés sur une souche à identifier, en ce sens, elle revêt une grande importance en microbiologie. Le substrat L-alanine- $\beta$ -naphthylamide est choisi pour mettre en évidence une activité L-alanine-aminopeptidase *via* la formation de  $\beta$ -naphthylamine.

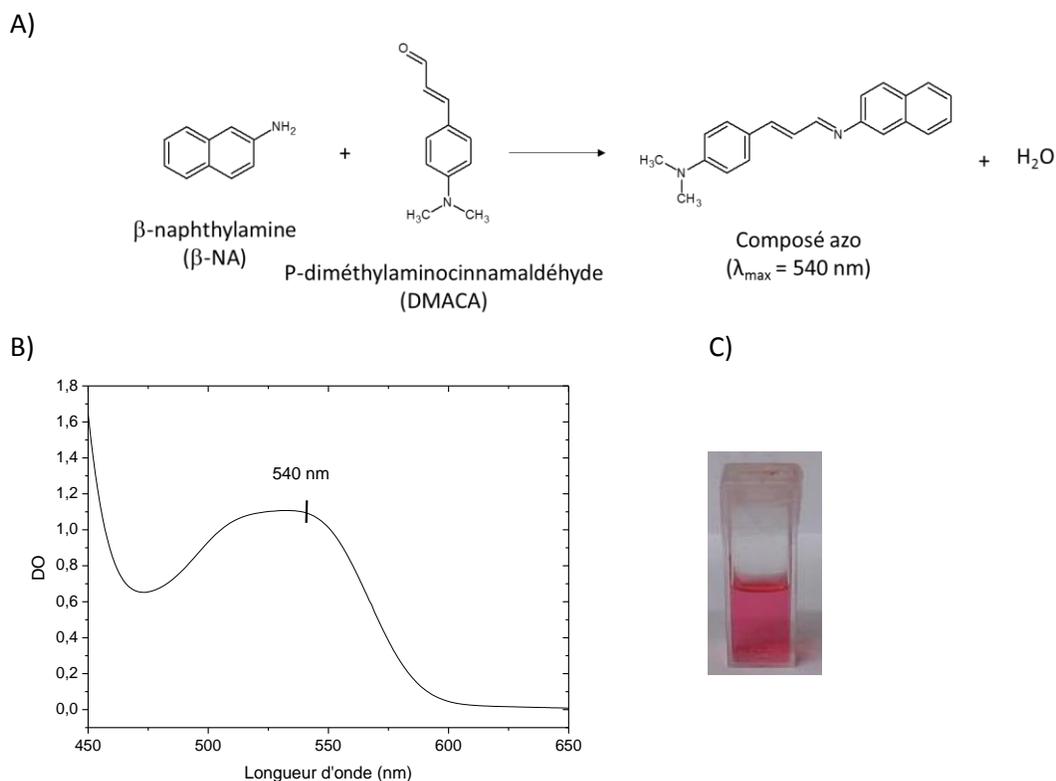
La  $\beta$ -naphthylamine ( $\beta$ -NA) a une constante de Henry de  $3,31 \cdot 10^{-6}$ . Sans être élevée, cette constante assure une concentration non négligeable dans l'espace de tête au-dessus d'une solution aqueuse. [12] Elle peut être mise en évidence suivant deux modes :

- En absorbance, en utilisant une molécule sonde, le para-diméthylaminocinnamaldéhyde (DMACA). La réaction entre ces deux composés en milieu acide forme un produit absorbant à 540 nm. [13]
- En fluorescence sans molécule sonde, excitée à  $\lambda_{\text{ex}} = 335$  nm, la  $\beta$ -NA émet de la fluorescence à  $\lambda_{\text{ém}} = 410$  nm. [14]

## 3. Détection de la $\beta$ -naphthylamine en absorbance après réaction avec une molécule sonde

### 3.1 Etude de la réaction sonde-cible en phase liquide

La réaction entre la  $\beta$ -NA et le DMACA se déroule en deux temps : la fonction amine nucléophile de la  $\beta$ -NA attaque la fonction aldéhyde du DMACA. En milieu acide, une réaction de condensation catalysée par les ions  $\text{H}^+$  conduit à la formation du composé azo coloré et à l'élimination d'une molécule d'eau (Figure 3.1). La réaction sonde-cible a été étudiée dans l'eau et dans l'éthanol. Dans un premier temps, la réaction a été étudiée à différents pH, puis le produit a été caractérisé, enfin, les réactions entre le DMACA et d'éventuels COV interférents ont été envisagées.



**Figure 3.1 : A) Réaction entre la molécule sonde (DMACA) et le COV exogène cible ( $\beta$ -NA). B) Spectre d'absorbance du produit azo, absorbant à 540 nm, formé par réaction entre le DMACA (2 mmol/L) et la  $\beta$ -NA (20  $\mu\text{mol/L}$ ) dans l'eau en présence de 0,26 mol/L HCl. C) Photographie d'une solution de DMACA ayant réagi avec la  $\beta$ -NA pour former le produit azo.**

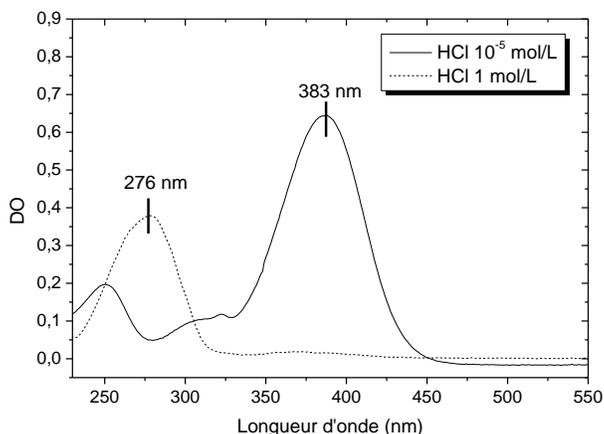
### 3.1.1 Choix du pH

Les  $\text{pK}_a$  de la  $\beta$ -NA et du DMACA sont respectivement  $\text{pK}_a(\beta\text{-NA}) = 4,16$  et  $\text{pK}_a(\text{DMACA}) = 3,18$ . [12][15]

Pour que la réaction ait lieu, la  $\beta$ -NA doit être sous sa forme moléculaire qui est nucléophile, c'est-à-dire à  $\text{pH} > \text{pK}_a(\beta\text{-NA})$ .

La forme neutre du DMACA absorbe à 385 nm avec un coefficient d'extinction molaire élevé ( $\epsilon_{383\text{nm}} = 35100 \pm 1020 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ), tandis que sa forme protonnée absorbe à 280 nm ( $\epsilon_{276\text{nm}} = 22300 \pm 650 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) (Figure 3.2). En se plaçant à pH trop élevé, à forte concentration en DMACA, la forte absorbance à 385 nm pourrait gêner la détection du produit azo.

Il faut donc faire un compromis entre un pH suffisamment élevé pour que la  $\beta$ -NA se trouve sous forme neutre, mais assez faible pour avoir un maximum de DMACA sous forme protonnée.

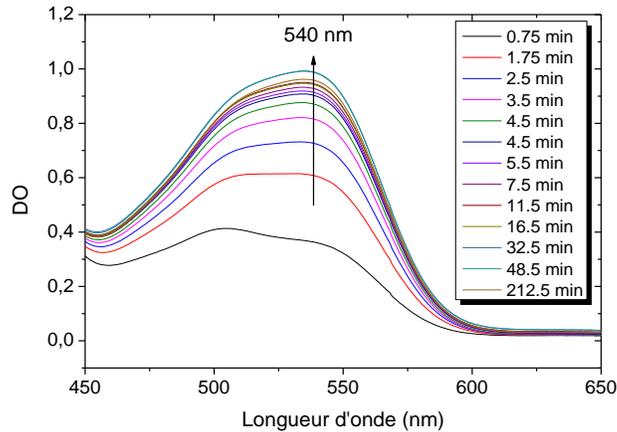


**Figure 3.2 : Spectres d'absorbance des deux formes du DMACA dans l'éthanol (C = 20  $\mu$ mol/L, chemin optique 1 cm).**

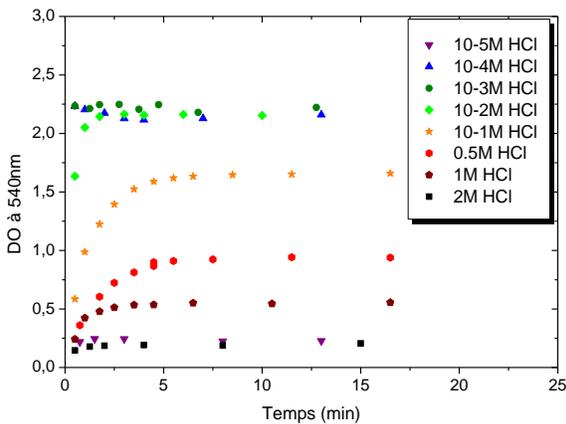
La surface des xérogels présente des groupements silanols, résidus d'une polycondensation incomplète des alcoxydes de silicium. Dans un premier temps, l'éthanol est utilisé comme solvant de réaction pour reproduire cet environnement. Pour déterminer les conditions optimales de réaction, différentes concentrations en acide chlorhydrique sont introduites. Le DMACA est introduit en excès : [DMACA] = 2 mmol/L et [ $\beta$ -NA] = 20  $\mu$ mol/L. La formation du produit absorbant à 540 nm a été suivie par spectroscopie UV-visible (Figure 3.3.A). Les rendements et vitesses de réaction maximaux ont été obtenus pour des concentrations en acide chlorhydrique de  $10^{-3}$  mol/L et  $10^{-4}$  mol/L (Figure 3.3.B et C). Pour des concentrations en acide chlorhydrique inférieures à  $10^{-4}$  mol/L, la réaction d'élimination de l'eau ne se fait pas, alors que pour des concentrations en acide supérieures à  $10^{-2}$  mol/L, c'est la réaction d'attaque nucléophile de la  $\beta$ -NA qui est défavorisée.

Cependant, aux concentrations d'acide chlorhydrique où la réaction se fait le mieux ( $10^{-3}$  mol/L et  $10^{-4}$  mol/L), le DMACA est sous sa forme qui absorbe fortement vers 400 nm ce qui est gênant pour la détection à 540 nm du produit azo. Une concentration de 0,5 mol/L en acide semble un bon compromis (Figure 3.3.B) pour avoir à la fois un bon rendement tout en favorisant la protonation du DMACA qui absorbe alors à 280 nm.

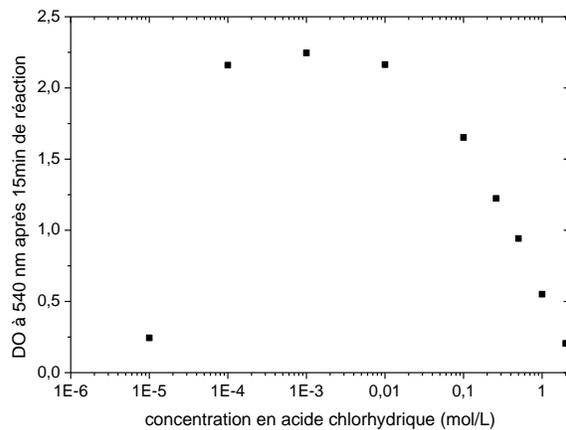
A)



B)

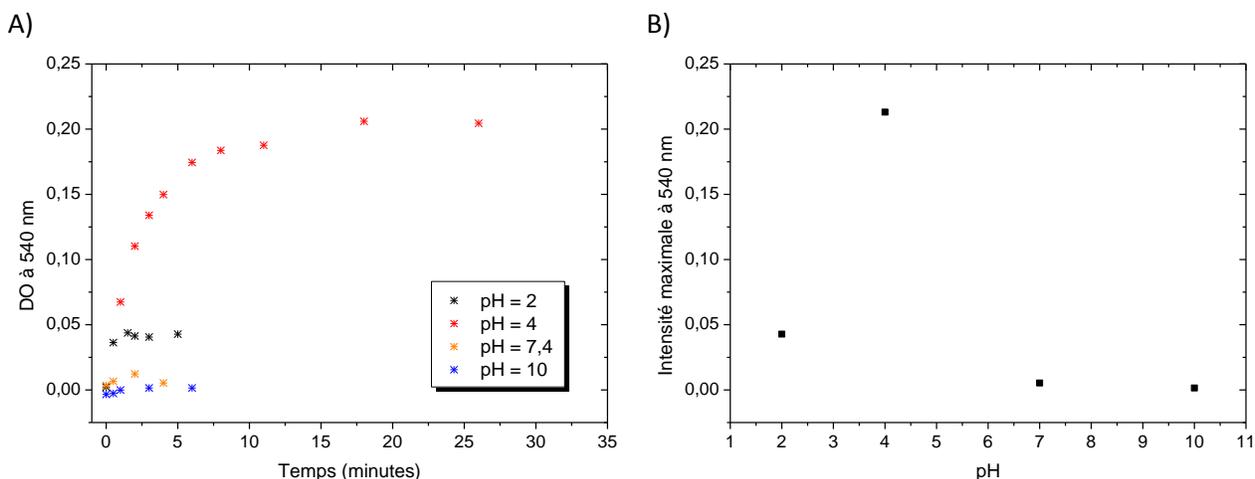


C)



**Figure 3.3 : Etude de la formation du produit azo dans l'éthanol contenant différentes concentrations d'HCl**  
**A) Evolution au cours du temps du spectre UV-visible du mélange réactionnel contenant 0,5 mol/L d'acide chlorhydrique ; B) suivi cinétique de l'apparition du pic à 540 nm ; C) intensité maximale du pic d'absorption du composé azo obtenu en fonction de la concentration en HCl.**

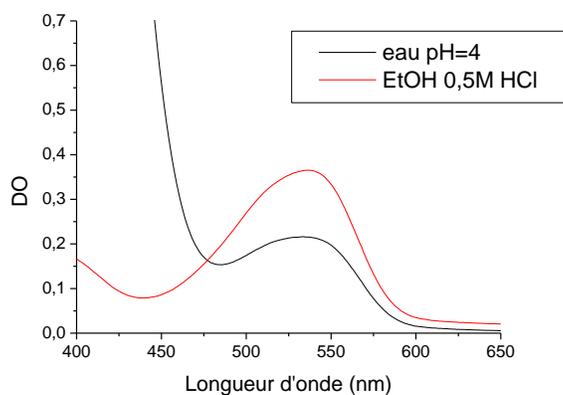
L'atmosphère au-dessus d'une culture bactérienne est très humide, et une partie de cette eau entrera dans les pores du xérogel. Il est donc nécessaire de savoir comment s'effectue la réaction du DMACA avec la  $\beta$ -NA en milieu aqueux. Comme dans l'éthanol, la formation du produit absorbant à 540 nm a été suivie par spectroscopie UV-visible dans l'eau tamponnée à différents pH entre 2 et 10. Contrairement au milieu éthanolique, le DMACA est très peu soluble dans l'eau ; les concentrations sont fixées à :  $[\text{DMACA}] = [\beta\text{-NA}] = 100 \mu\text{mol/L}$ . La réaction se fait en dix minutes à pH = 4 mais pas à pH = 2 ni au-delà de pH = 7 (Figure 3.4).



**Figure 3.4 : Etude de la réaction de formation du produit azo dans l'eau à différents pH. A) Suivi cinétique de l'apparition du pic à 540 nm ; B) Intensité maximale du pic d'absorption du composé azo obtenue en fonction du pH.**

En outre, la Figure 3.5 met en évidence que la présence d'eau est plutôt défavorable à la réaction sonde-cible puisque :

- le rendement reste inférieur à celui obtenu pour les mêmes concentrations en réactifs ( $[DMACA] = [\beta\text{-NA}] = 100 \mu\text{mol/L}$ ) lorsque la réaction a lieu dans l'éthanol avec une concentration en acide chlorhydrique de 0,5 mol/L ;
- à pH = 4 dans l'eau, le DMACA est présent sous sa forme neutre et absorbe fortement à 383 nm. Dans l'éthanol avec 0,5 mol/L d'HCl, ce pic est moindre.

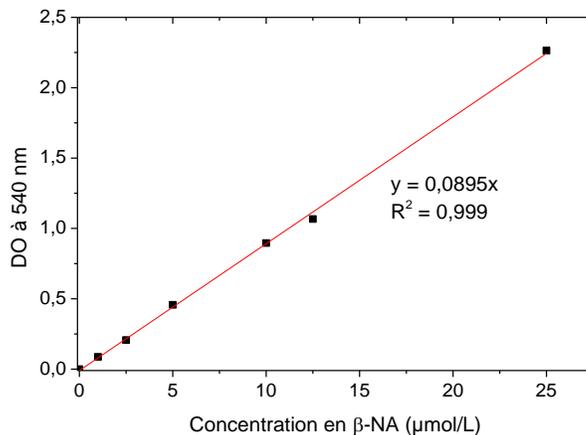


**Figure 3.5 : Spectres d'absorbance UV-visible des milieux réactionnels pour des concentrations en DMACA et  $\beta$ -NA de 100  $\mu\text{mol/L}$  dans l'eau tamponnée à pH 4 et dans l'éthanol avec 0,5 mol/L d'HCl**

### 3.1.2 Caractérisation du produit azo formé

Le coefficient d'extinction molaire du produit azo a été mesuré dans l'éthanol acidifié avec  $10^{-3}$  mol/L d'acide chlorhydrique (Figure 3.6). A cette concentration en acide, le rendement de la réaction entre la  $\beta$ -NA et le DMACA était le meilleur (Figure 3.3). Un large excès de DMACA a été

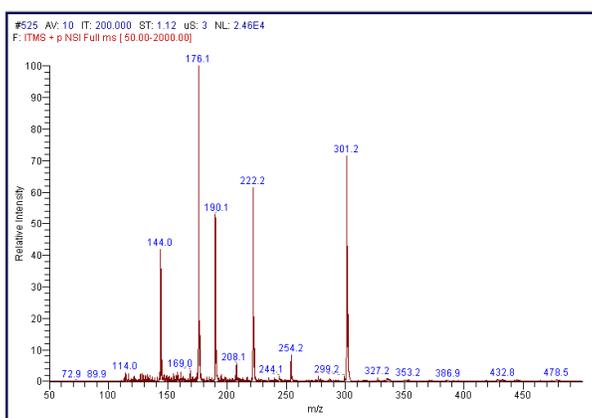
utilisé :  $[DMACA] = 2 \text{ mmol/L}$ ,  $[\beta\text{-naphthylamine}] = 1 \text{ à } 50 \text{ }\mu\text{mol/L}$ . Si on suppose que la réaction est totale, c'est-à-dire que toute la  $\beta$ -NA a réagi alors :  $[\text{produit}] = [\beta\text{-NA}]$ . Le coefficient d'extinction molaire mesuré est  $\epsilon = 89500 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ . Cette valeur élevée est donc intéressante pour une détection en absorbance.



**Figure 3.6 : Détermination du coefficient d'extinction molaire du produit azo à 540 nm dans l'éthanol acidifié à  $10^{-3} \text{ mol/L}$  d'acide chlorhydrique.**

Afin de vérifier la structure proposée pour le produit de la réaction du DMACA avec la  $\beta$ -naphthylamine, un spectre de masse des réactifs et du milieu réactionnel ont été réalisés avec un spectromètre Finnigan LTQ (ThermoScientific) (Figure 3.7).

Le pic à  $m/z=144$  correspond à la  $\beta$ -naphthylamine protonnée, le pic à  $m/z=176$  correspond au DMACA protonné. On retrouve sur le spectre de masse du milieu réactionnel les pics observés sur les spectres de masse des réactifs. **Un nouveau pic à  $m/z = 301$  est observé et correspond à la masse d'une molécule de produit azo** protonnée une fois. [13] Il semble que les pics à  $m/z = 222$  et 254 correspondent à des adduits de méthanol qui est le solvant utilisé ( $m/z$  du solvant = 32). En effet :  $222 = 190+32$  et  $254 = 190+2 \times 32$ . Cependant, le pic à  $m/z = 190$  n'a pas été attribué.



**Figure 3.7 : Spectre de masse du milieu réactionnel contenant le DMACA et la  $\beta$ -naphthylamine dans le méthanol acidifié avec de l'acide chlorhydrique.**

### 3.1.3 Evaluation d'interférents potentiels

Le DMACA peut réagir avec de nombreux composés comportant une fonction amine. [15][16]  
Parmi ces composés, plusieurs peuvent se trouver dans un milieu de culture:

- Le tryptophane : cet acide aminé est présent en grande quantité dans les milieux riches en protéines. Le tryptophane est issu de la dégradation de ces protéines.
- L'indole : il est obtenu par dégradation du tryptophane par l'enzyme tryptophanase. Cette enzyme est présente chez les bactéries dites « indole positives » (*E. coli* par exemple).
- La 2'-aminoacétophénone: messenger chimique émis par certaines bactéries, comme *P. aeruginosa*, ce métabolite est également issu de la dégradation du tryptophane.
- Le 3-méthylindole (scatole) : certaines bactéries possèdent une activité enzymatique méthyltransférase qui déplace un groupement méthyl d'un substrat à un autre. Pour ces espèces, le 3-méthylindole peut donc être présent dans des milieux contenant de l'indole.

Les paramètres qui permettent d'évaluer si un composé est un interférent sont :

- sa constante de Henry ( $H_{cc}$ ),
- la longueur d'onde à laquelle le produit de la réaction avec le DMACA absorbe ( $\lambda_{max}$ ),
- le coefficient d'extinction molaire du produit ( $\epsilon$ ) et la vitesse à laquelle il se forme.

Ces valeurs sont données pour chacune des molécules mentionnées dans le Tableau 3.2.

Le scatole et l'indole forment avec le DMACA des produits absorbants à des longueurs d'onde éloignées de 540 nm. Ils ne seront donc pas des interférents.

Le tryptophane forme avec le DMACA un composé qui absorbe à 542 nm, longueur d'onde à laquelle est aussi observé le produit de réaction entre le DMACA et la  $\beta$ -NA. Néanmoins, le tryptophane ne gênera pas la détection de la  $\beta$ -NA pour deux raisons : d'une part, le produit formé a un coefficient d'extinction molaire très faible ( $\epsilon < 100 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ) ; d'autre part, la constante de Henry du tryptophane est très faible ( $H_{cc} = 8,1.10^{-13}$ ), il sera donc très peu présent dans la phase gazeuse.

Enfin, la 2'-amino-acétophénone réagit avec le DMACA en formant un produit qui absorbe à 550 nm, c'est-à-dire à une longueur d'onde très proche du produit azo. Cependant, le produit formé a un coefficient d'extinction molaire faible ( $5535 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ) relativement à celui du produit azo ( $89500 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ). En outre, la constante de Henry de cette acétophénone est bien plus faible que celle de la  $\beta$ -NA, elle ne devrait être présente qu'en quantité limitée dans la phase gazeuse.

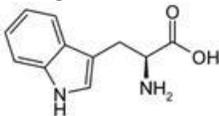
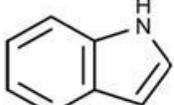
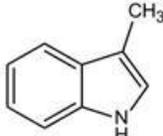
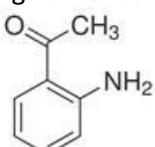
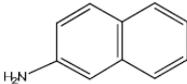
Interfèrent Constante de Henry $H_{CC}$ à 298 K	Propriétés du produit formé	
	Pic 1	Pic 2
Tryptophane CAS 73-22-3 Sigma T0254  $H_{CC} = 8,1.10^{-13}$	$\lambda_{max} = 542 \text{ nm}$ $\epsilon < 100 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ $V = 0,013 \text{ min}^{-1}$	$\lambda_{max} = 585 \text{ nm}$ $\epsilon < 100 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ $V = 0,02 \text{ min}^{-1}$
Indole CAS 120-72-9 Sigma I3408  $H_{CC} = 2,16.10^{-5}$	$\lambda_{max} = 624 \text{ nm}$ $\epsilon = 103900 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ $V = 0,02 \text{ min}^{-1}$	/
Scatole CAS 100-02-7 Sigma M51458  $H_{CC} = 8,7.10^{-5}$	$\lambda_{max} = 620 \text{ nm}$ $\epsilon = 18592 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ $V = 0,004 \text{ min}^{-1}$	$\lambda_{max} = 664 \text{ nm}$ $\epsilon = 26881 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ $V = 0,006 \text{ min}^{-1}$
2'-amino-acétophénone CAS 83-34-1 Sigma A37804  $H_{CC} = 1,4.10^{-7}$	$\lambda_{max} = 550 \text{ nm}$ $\epsilon = 5535 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ Très rapide	/
$\beta$ -naphthylamine CAS 91-59-8 Sigma N8381  $H_{CC} = 3,31.10^{-6}$	$\lambda_{max} = 540 \text{ nm}$ $\epsilon = 89500 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ $V = 0,16 \text{ min}^{-1}$	/

Tableau 3.2 : Tableau récapitulatif des caractéristiques des produits formés entre le DMACA et des éventuels COV interférents : constante de Henry sans dimension (gaz/liquide), longueur d'onde (nm) et extinction molaire ( $\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ) au maximum d'absorbance, vitesse de formation ( $\text{min}^{-1}$ ).

### 3.2 Mise en évidence de l'activité chez plusieurs souches

Plusieurs souches de micro-organismes, des Gram positives et Gram négatives, sont utilisées pour la mise en évidence de l'activité enzymatique L-alanine aminopeptidase. Des milieux gélosés dont la composition est détaillée en Annexe 7.3 et contenant du substrat L-alanine- $\beta$ -naphthylamide à hauteur de 250  $\mu\text{mol/L}$  sont inoculés avec plusieurs colonies d'une souche puis incubés à 37°C. Afin d'éviter que la  $\beta$ -NA formée ne s'échappe, les boîtes de Petri sont fermées hermétiquement à l'aide de parafilm.

Après 24 heures d'incubation à 37°C, les colonies formées sont prélevées et introduites dans 800  $\mu\text{L}$  d'une solution éthanolique de 500  $\mu\text{mol/L}$  de DMACA acidifiée avec 0,5 mol/L d'acide chlorhydrique. Puis, ces solutions sont filtrées (0,2  $\mu\text{m}$ ) afin d'enlever les résidus de micro-organismes et de mesurer un spectre UV-visible.

Les solutions issues des souches L-alanine- $\beta$ -naphthylamidase-positives ayant libéré de la  $\beta$ -naphthylamine sont roses et leur spectre d'absorption présente un maximum à 540 nm (Figure 3.8 A). En absence de  $\beta$ -naphthylamine, les solutions restent jaune pâle, couleur du DMACA. Le substrat gélosé utilisé contient une variété d'acides aminés parmi lesquels le tryptophane. Les souches pouvant produire l'enzyme tryptophanase forment de l'indole qui réagit avec le DMACA pour donner un produit absorbant à 624 nm. Pour ces souches, la solution prend une coloration bleue (Figure 3.8.B). C'est le cas pour les quatre souches d'*Escherichia coli*.

Les résultats obtenus montrent qu'une souche Gram+ (*Staphylococcus intermedius*) et une levure (*Candida albicans*) présentent l'activité L-alanine- $\beta$ -naphthylamidase. **En dehors de ces deux souches, l'activité L-alanine- $\beta$ -naphthylamidase n'est présente que chez les Gram- dans les souches testées** (Tableau 3.3).

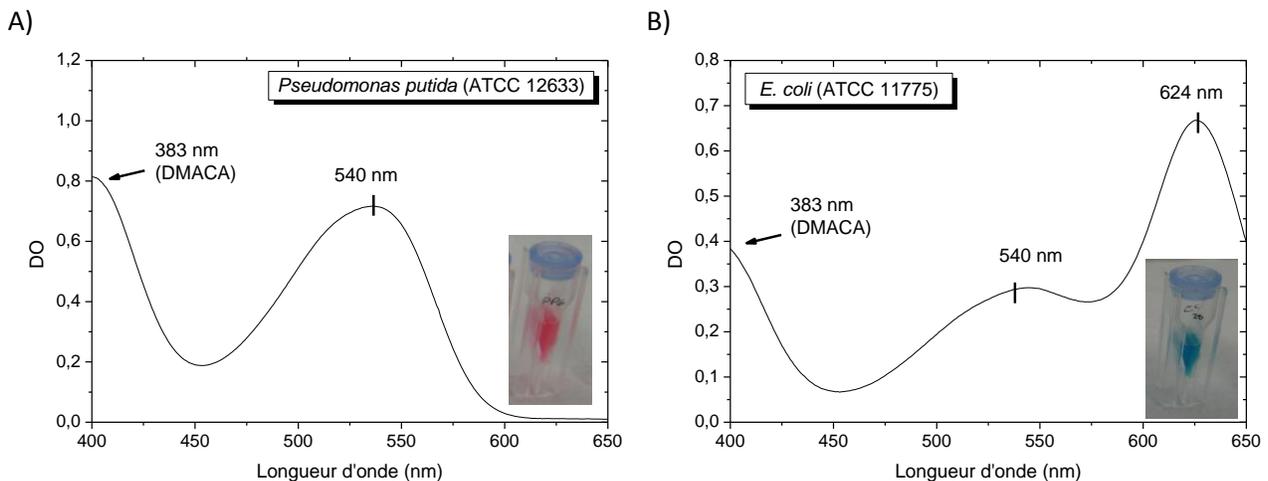


Figure 3.8 : Spectres d'absorption et photographie des solutions filtrées

<b>Espèce</b>	<b>Souche</b>	<b>Gram</b>	<b>Activité L-alanine-<math>\beta</math>-naphthylamidase</b>	<b>Activité tryptophanase</b>
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 35421	Gram -	+	+
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 11775	Gram -	+	+
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739	Gram -	+	+
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	Gram -	+	+
<i>Staphylococcus intermedius</i>	Pas de numéro ATCC	Gram +	+	-
<i>Pseudomonas putida</i>	ATCC 12633	Gram -	+	-
<i>Hafnia alvei</i>	ATCC 13337	Gram -	+	-
<i>Candida albicans</i>	ATCC18804	Levure	+	-
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	ATCC 51331	Gram -	+	-
<i>Acinetobacter baumannii</i>	ATCC 23220	Gram -	+	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC 13048	Gram -	+	-
<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC 8090	Gram -	+	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC 13047	Gram -	+	-
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	ATCC 13843	Gram -	+	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 49741	Gram +	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	Pas de numéro ATCC	Gram +	-	-

**Tableau 3.3 : Caractéristiques enzymatiques des souches étudiées pour la mise en évidence de l'activité L-alanine- $\beta$ -naphthylamidase.**

### 3.3 Synthèse et caractérisation de xérogels dopés au DMACA

Après avoir étudié la réaction sonde-cible en solution, des capteurs ont été préparés et testés vis-à-vis d'atmosphères contenant de la  $\beta$ -naphthylamine sous forme gazeuse.

#### 3.3.1 Synthèse des xérogels

Des xérogels contenant différentes quantités d'acide chlorhydrique et de DMACA sont préparés (Tableau 3.4). Le protocole est détaillé en Annexe 3.2. Le sol est préparé dans le méthanol à partir de précurseurs tétraméthylorthosilicate (TMOS), aminopropyl-triéthoxysilane (APTES) et d'eau. Les ratios molaires sont les suivants : TMOS/MeOH/APTES/eau = 1/5/0,03/4. Le sol est moulé dans des cuves de spectroscopie (EVERGREEN) afin de donner une forme parallélogramme aux xérogels obtenus. Après séchage, les gels se sont rétractés d'un facteur 2 dans toutes les dimensions et les xérogels finaux ont les dimensions suivantes : 2 mm x 5 mm x 1,25 mm. Les concentrations dans les xérogels sont donc huit fois plus élevées que celles introduites dans le sol. Les concentrations indiquées dans le Tableau 3.4 correspondent aux concentrations dans les xérogels finaux.

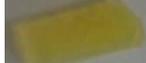
	[HCl] = 2 mol/L	[HCl] = 1 mol/L	[HCl] = 0,5 mol/L	[HCl] = 10 <sup>-2</sup> mol/L	[HCl] = 10 <sup>-4</sup> mol/L
[DMACA] = 10 mmol/L					
[DMACA] = 2 mmol/L					
[DMACA] = 1 mmol/L					
[DMACA] = 0,5 mmol/L					
[DMACA] = 0,1 mmol/L					

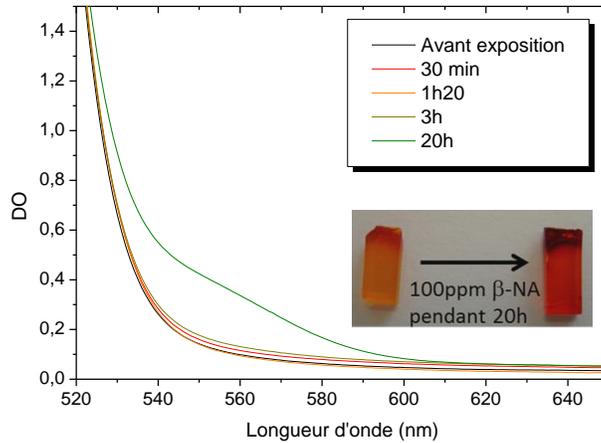
Tableau 3.4 : Composition des xérogels préparés pour la détection de  $\beta$ -naphthylamine en phase gazeuse.

Les xérogels contenant 0,5 mol/L d'acide et 2 mmol/L ou 10 mmol/L de DMACA, présentent une distribution inhomogène de la molécule sonde. Au cours du séchage, le solvant entraîne avec lui la molécule sonde vers la face supérieure du gel où se produit l'évaporation. Comme le DMACA n'est pas volatil, il s'accumule au niveau de cette face.

#### 3.3.2 Exposition des xérogels à la $\beta$ -naphthylamine

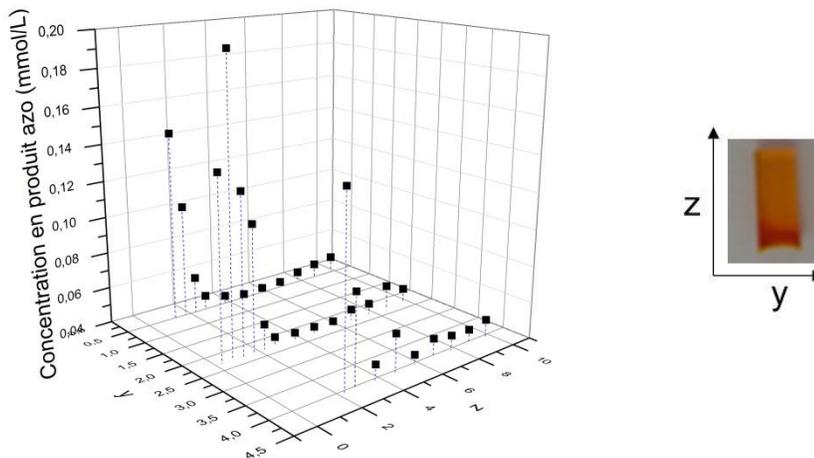
Tous les xérogels synthétisés ont été exposés à 100 ppm de  $\beta$ -NA de la manière suivante : un récipient en verre de volume 100 mL fermé contient le xérogel à exposer et un morceau d'aluminium chauffé à 60°C. Grâce à une seringue à travers le bouchon, 10  $\mu$ L d'une solution éthanolique de  $\beta$ -NA 44 mmol/L sont déposés sur le morceau d'aluminium, de manière à évaporer totalement la solution éthanolique d'amine aromatique. Le montage est ensuite placé dans une étuve à 37°C (détails en Annexe 6.3).

Le spectre d'absorbance des xérogels est acquis avant et après 24 heures d'exposition. Seul celui dopé avec 2 mmol/L de DMACA et 0,5 mol/L d'acide chlorhydrique présente une modification de son spectre d'absorbance, visible à l'œil par un changement de couleur de l'orange au rouge (Figure 3.9).



**Figure 3.9 : Spectres d'absorbance d'un xérogel dopé avec 2 mmol/L de DMACA et 0,5 mol/L d'HCl (épaisseur 2 mm), après exposition à 100 ppm de  $\beta$ -naphthylamine pendant 20 heures.**

Comme la molécule sonde n'est pas répartie de manière homogène dans le xérogel, la quantité de produit azo formé n'est pas la même dans tout le volume. Pour avoir accès à la quantité de produit azo formé, donc à la quantité de  $\beta$ -NA qui a réagi, un profil d'absorbance est mesuré sur un xérogel avant et après exposition. Il s'agit de mesurer l'absorbance en différents points du xérogel (Annexe 9). Cette opération est effectuée pour un xérogel dopé avec 2 mmol/L de DMACA et 0,5 mol/L d'HCl, avant et après exposition à 100 ppm de  $\beta$ -NA (Figure 3.10).



**Figure 3.10 : Profil de concentration en produit azo dans le monolithe 2 mmol/L DMACA-0,5 mol/L HCl exposé à 100 ppm de  $\beta$ -naphthylamine pendant 20 heures.**

La différence entre les profils avant et après exposition correspond à l'absorbance du produit formé. Il suffit alors de normaliser par le coefficient d'extinction molaire du produit mesuré ( $\epsilon = 89500 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) et l'épaisseur traversée par le faisceau (2 mm) pour connaître la concentration

en produit dans la zone sondée. On émet l'hypothèse que le coefficient d'extinction molaire du produit est le même dans l'éthanol que dans le xérogel. La zone sondée par le faisceau lumineux est de  $1 \text{ mm}^2 \times 2 \text{ mm}$  soit  $2 \text{ mm}^3$ . En intégrant le profil de concentration (Annexe 9), sur tout le volume du xérogel, la quantité de produit formé a pu être estimée : 8 nmol, c'est-à-dire que 8 nmol de  $\beta$ -NA ont réagi avec le DMACA. Or, pour obtenir une atmosphère à 100 ppm, 440 nmol de  $\beta$ -NA ont été utilisées, donc seulement 2% de la  $\beta$ -NA introduite a réagi avec le DMACA.

L'étude de la détection de la  $\beta$ -naphthylamine en absorbance avec une molécule sonde s'est révélée assez complexe. Il existe des contraintes de pH pour que la réaction se fasse et que l'absorbance de la molécule sonde soit limitée. De plus, le rendement de la réaction se dégrade en milieu aqueux. Parmi les xérogels synthétisés, une formulation ( $[\text{DMACA}] = 2 \text{ mM}$  ;  $[\text{HCl}] = 0,5 \text{ M}$ ) nous a permis de détecter 100 ppm de  $\beta$ -naphthylamine entre 3 et 20 heures d'exposition. Plusieurs améliorations peuvent être apportées :

- Avec un coefficient de partage octanol/eau de 2,28, la  $\beta$ -naphthylamine est un composé plutôt hydrophobe. [12] En utilisant des précurseurs alcoxydes avec une fonction organique hydrophobe, les xérogels pourraient avoir une affinité plus importante avec la  $\beta$ -naphthylamine et moins avec l'eau qui entrave la réaction sonde-cible.
- Un chemin optique plus faible (par exemple des xérogels plus fins) permettrait, à concentration de sonde constante, d'employer davantage la forme moléculaire (pic à 385nm) par rapport à la forme acide (pic à 276nm). Cela permettrait ainsi de travailler avec des concentrations d'acide moins importantes ( $10^{-3}$ - $10^{-4}$  mol/L), conditions dans lesquelles le rendement de la réaction est meilleur.

## 4. Détection de la $\beta$ -naphthylamine en fluorescence

### 4.1 Propriétés de fluorescence

Lorsqu'elle est excitée à  $\lambda_{\text{ex}} = 335 \text{ nm}$ , la  $\beta$ -NA émet de la fluorescence à  $\lambda_{\text{em}} = 410 \text{ nm}$  (Figure 3.11). Le rendement quantique de fluorescence ( $\Phi_f$ ) est défini comme la fraction de molécules excitées qui retournent à l'état fondamental avec émission de fluorescence. Autrement dit, il s'agit du rapport entre la quantité de photons émis, c'est-à-dire l'intégrale sous la courbe de fluorescence, et la quantité de photons reçus qui correspond à l'absorbance à 340 nm. Le rendement quantique de la  $\beta$ -NA dans le méthanol a été mesuré en utilisant comme référence la quinine disulfate dans  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,05 mol/L (Tableau 3.5). Si la valeur de rendement quantique mesurée dans le méthanol est inférieure à celles données dans la littérature, ce rendement reste néanmoins élevé et encourageant pour une détection de la  $\beta$ -NA en fluorescence. Enfin, il est beaucoup plus intéressant de détecter la forme moléculaire de la  $\beta$ -NA, le cation naphthylammonium ayant un rendement quantique bien plus faible. Cela signifie que la matrice sol-gel devra avoir un pH intrapore supérieur au  $\text{pK}_a$  de la  $\beta$ -NA, soit 4,16.

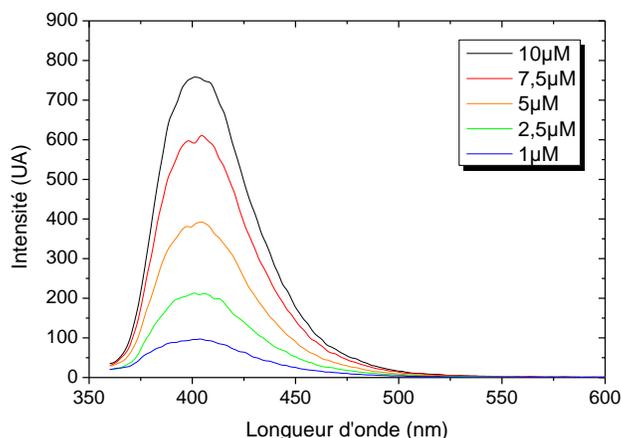


Figure 3.11 : Spectre d'émission de fluorescence de la  $\beta$ -naphthylamine dans le méthanol pour une excitation à 335 nm.

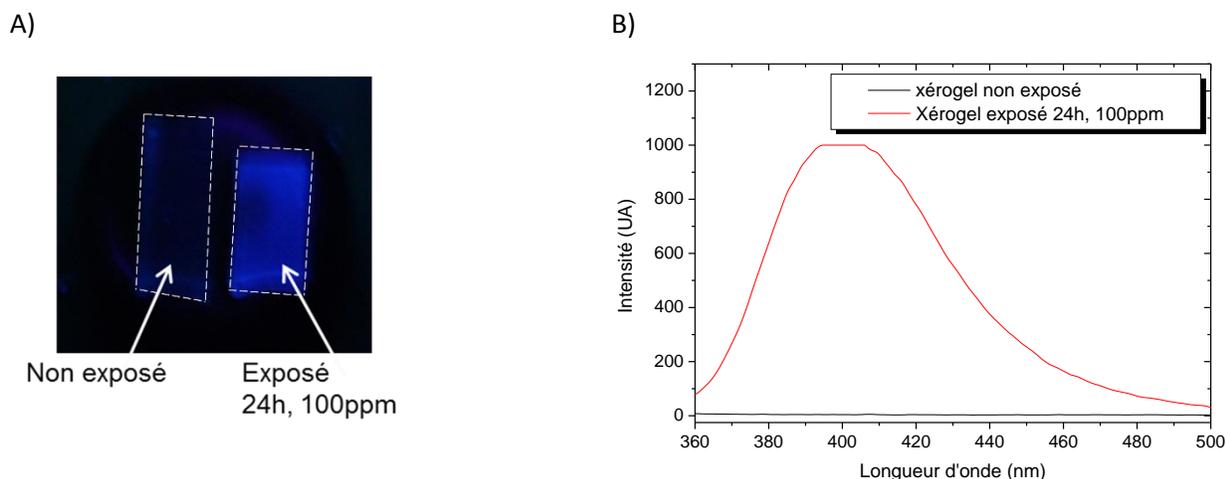
	Rendement quantique	solvant	référence
<b>Mesuré</b>	0,29 ( $\pm 0,03$ )	Méthanol	/
<b>Littérature</b>	0,66	Eau	[17]
	0,32	n-heptane	[17]
	0,46	Ethanol	[18]
	0,33	Cyclohexane	[18]

Tableau 3.5 : Rendements quantiques de la  $\beta$ -naphthylamine dans différents solvants.

## 4.2 Mise en évidence de la $\beta$ -naphthylamine dans des xérogels par fluorescence

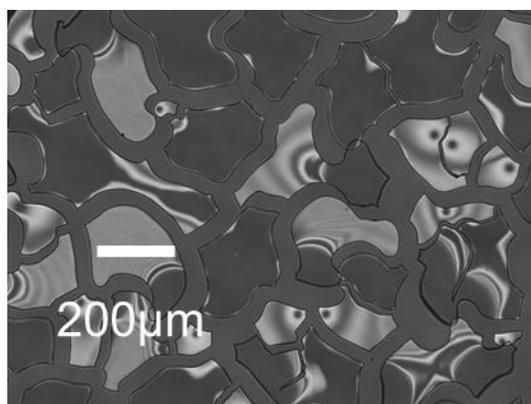
La forme fluorescente de la  $\beta$ -naphthylamine est la forme neutre, c'est-à-dire à  $\text{pH} > 4,16$ . Afin de pouvoir la détecter dans un xérogel, le  $\text{pH}$  intrapore doit donc être supérieur à cette valeur. Nous avons vu dans le chapitre 2 que les xérogels avec un ratio TMOS/APTES de 1/0,03 ont un  $\text{pH}$  intrapore de 7,01. Dans un tel xérogel, la  $\beta$ -NA, une fois captée, est maintenue sous sa forme neutre.

Un xérogel de formulation TMOS/MeOH/APTES/H<sub>2</sub>O = 1/5/0,03/4 a été exposé à 100 ppm de  $\beta$ -NA pendant 24 heures (protocole en Annexe 6.3). Lorsqu'il est placé sous une lampe UV normalement destinée à la révélation de plaques de chromatographie sur couche mince ( $\lambda_{\text{ex}} = 365 \text{ nm}$ ), le xérogel présente une fluorescence bleue (Figure 3.12.A). Un spectre d'émission de fluorescence est réalisé avec un spectrofluorimètre PERKIN ELMER LS 50 B équipé d'une lampe à Xénon. Le xérogel est placé de telle sorte que le faisceau d'excitation arrive avec un angle de  $45^\circ$  (Figure 3.12.B). Cette observation est en accord avec les mesures réalisées en phase liquide où l'émission de fluorescence est centrée à 410 nm.



**Figure 3.12 : A) Photographie, sous lampe UV, d'un xérogel non exposé et d'un xérogel exposé à 100ppm de  $\beta$ -naphthylamine pendant 24 heures,  $\lambda_{\text{excitation}} = 365 \text{ nm}$ . B) Spectres d'émission des xérogels exposés et non exposés à la  $\beta$ -naphthylamine,  $\lambda_{\text{excitation}} = 335 \text{ nm}$**

Un xérogel de 2 mm d'épaisseur a une absorbance non négligeable aux longueurs d'onde d'excitation et d'émission de la  $\beta$ -NA :  $DO_{365\text{nm}} = 0,05$  et  $DO_{410\text{nm}} = 0,03$ . Afin d'éviter à la fois une absorption des photons d'excitation et des photons émis en fluorescence par la matrice de silice, des films minces supportés par des lames en verre ont été testés à la place des monolithes. Les films sont réalisés par spin-coating. Les proportions en réactifs sont les suivantes : TMOS/APTES/MeOH/eau : 1/0,03/4/4. 500  $\mu\text{L}$  de sol sont déposés sur une lame de microscope en verre fixée sur un appareil de spin-coating. Après une minute à 1000 tours/minute, le sol s'est étalé sur la lame et a gélifié. En séchant, le gel tend à se rétracter alors qu'il est lié au substrat, cela provoque une fragmentation du film (Figure 3.13). Les franges d'interférences indiquent que l'épaisseur n'est pas constante ; l'épaisseur moyenne est de 14  $\mu\text{m}$ .

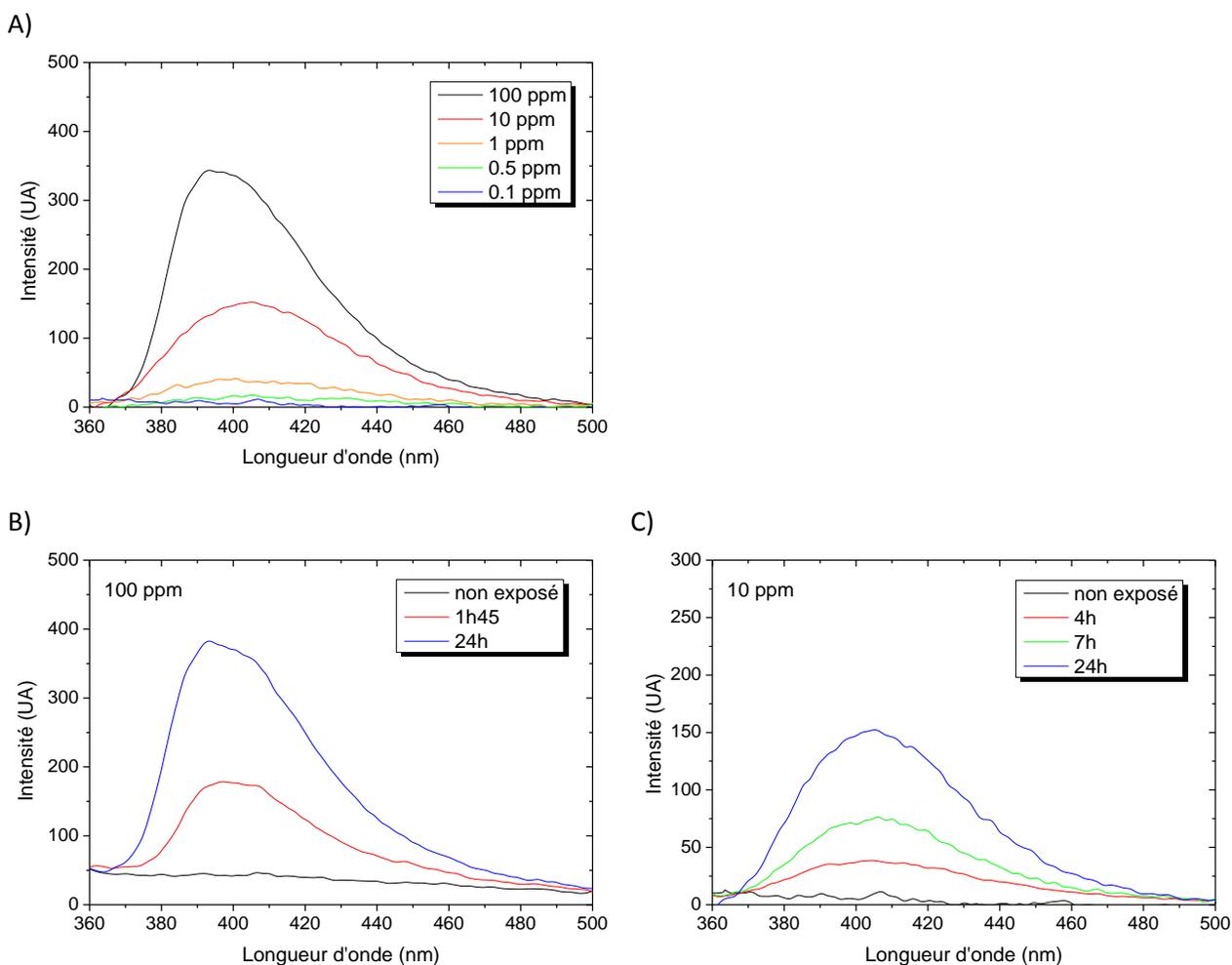


**Figure 3.13 : Photographie au microscope optique d'un film supporté par une lame de verre.**

Les lames avec le dépôt sont ensuite exposées suivant le même protocole à différentes concentrations de  $\beta$ -NA. Pour s'assurer qu'il n'y ait pas de biais dû à des films différents (notamment en termes d'épaisseur et de porosité), les expositions à différentes concentrations sont réalisées avec un film qui a été coupé en plusieurs morceaux. La Figure 3.14 donne les résultats de ces expositions. Au fur

et à mesure de l'accumulation de  $\beta$ -NA dans les pores des films, le pic d'émission est décalé vers les basses longueurs d'ondes. Ce là est dû à un effet de  $\pi$ -stacking (empilement par les orbitales  $\pi$ ) observé lorsque la concentration de  $\beta$ -NA dans les pores est élevée.

La détection de la  $\beta$ -naphthylamine en fluorescence présente deux avantages : elle est plus simple à mettre en œuvre car le xérogel n'a pas besoin d'être dopé avec une molécule sonde. Elle est aussi plus sensible puisqu'une détection de 10 ppm de  $\beta$ -naphthylamine est possible en quatre heures (Figure 3.14.C). Encore une fois, il est possible d'améliorer ce type de capteur, à la fois en jouant sur la formulation des films et sur l'instrumentation à mettre en place pour la lecture en fluorescence.



**Figure 3.14 : A) Spectres d'émission de fluorescence de films exposés à différentes concentrations de  $\beta$ -naphthylamine gazeuse pendant 24 heures,  $\lambda_{\text{excitation}} = 340$  nm. B et C) Spectres d'émission de fluorescence de films exposés à 100 ppm et 10 ppm de  $\beta$ -naphthylamine,  $\lambda_{\text{excitation}} = 335$  nm.**

## Conclusion

La  $\beta$ -naphthylamine est une amine volatile de choix pour la mise en évidence de l'activité L-alanine arylamidase spécifique des Gram-. En effet, elle peut être mise en évidence optiquement selon

deux modes : en absorbance avec une molécule sonde (le DMACA) et en fluorescence sans sonde. Après avoir cherché les conditions de réaction optimales en solution, des xérogels dopés avec du DMACA et de l'acide chlorhydrique ont été synthétisés par voie sol-gel. La détection en absorbance s'est révélée difficile à mettre en œuvre, en particulier à cause des contraintes sur le pH. La sensibilité des capteurs reste limitée à 100 ppm. Comme pour les capteurs de CSV où l'absorbance de la molécule sonde (DTNB) était importante, la diminution de l'épaisseur des xérogels dopés DMACA permettrait à la fois de diminuer l'absorbance de la molécule sonde à 385 nm et de travailler à des concentrations en acide moins importantes ( $10^{-3}$ - $10^{-4}$  mol/L).

Néanmoins, la mise en évidence de la  $\beta$ -naphthylamine en fluorescence semble plus prometteuse. Des capteurs sous forme de films mince ont permis de détecter jusqu'à 10 ppm de  $\beta$ -naphthylamine en quatre heures. Un travail d'optimisation des films et de l'instrumentation de lecture devrait permettre d'améliorer la sensibilité des capteurs.

La détection non invasive de peptidases trouve plusieurs applications telles que la L-alanine-aminopeptidase pour la détermination précoce du caractère Gram+/ Gram-, mais aussi d'autres activités comme par exemple la  $\beta$ -alanine-arylamidase présente chez peu de Gram- en dehors de *Pseudomonas aeruginosa*, un pathogène souvent impliqué dans des cas de septicémies.

## Références bibliographiques

- [1] S. Orega, A. L. James, M. Manafi, J. D. Perry, and D. H. Pincus, "Enzymatic substrates in microbiology," *J. Microbiol. Methods*, vol. 79, no. 2, pp. 139–155, Nov. 2009.
- [2] M. Manafi and W. Kneifel, "Rapid methods for differentiating Gram-positive from Gram-negative aerobic and facultative anaerobic bacteria," *J. Appl. Bacteriol.*, vol. 69, no. 6, pp. 822–827, 1990.
- [3] G. Zambardi and J.-M. Roche, "Reaction medium for methicilin-resistant staphylococcus aureus (MRSA) bacteria," WO2011018589 A2, 2011.
- [4] J. D. Perry, C. Rennison, L. A. Butterworth, A. L. J. Hopley, and F. K. Gould, "Evaluation of S. aureus ID, a New Chromogenic Agar Medium for Detection of Staphylococcus aureus," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 41, no. 12, pp. 5695–5698, Dec. 2003.
- [5] S. Orega, A. L. James, M. Manafi, J. D. Perry, and D. H. Pincus, "Enzymatic substrates in microbiology," *J. Microbiol. Methods*, vol. 79, no. 2, pp. 139–155, Nov. 2009.
- [6] E. Torlak, İ. m. Akan, and M. Gökmen, "Comparison of TEMPO® EC and TBX medium for the enumeration of Escherichia coli in cheese," *Let. Appl. Microbiol.*, vol. 47, no. 6, pp. 566–570, décembre 2008.
- [7] B. Brown, A. Fourneron, R. Deschomets, M. T. Lescure, and T. Sofia, "Evaluation of the Automated TEMPO System for Enumeration of Escherichia coli in Food Products." .
- [8] A. Visbecq, *Bactériémies, Un défi à l'hôpital*. 2011.
- [9] AFSSA, "Bulletins du réseau Salmonella." 2006.
- [10] J. D. Perry and A. M. Freydière, "The application of chromogenic media in clinical microbiology: Application of chromogenic media," *J. Appl. Microbiol.*, vol. 103, no. 6, pp. 2046–2055, Jul. 2007.
- [11] W. F. Lauer and F. L. Martinez, "RAPID'Salmonella (TM) Chromogenic Medium," *J. Aoac Int.*, vol. 92, no. 6, pp. 1871–1875, Dec. 2009.
- [12] "<http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/chemidlite.jsp>." US National library of medicine.
- [13] V. Acosta-Martinez and M. A. Tabatabai, "Arylamidase activity of soil," *Soil Sci. Soc. Am. J.*, vol. 64, no. 1, pp. 215–221, 2000.
- [14] P. S. Riley and F. J. Behal, "Amino Acid- $\beta$ -Naphthylamide Hydrolysis by Pseudomonas aeruginosa Arylamidase," *J. Bacteriol.*, vol. 108, no. 2, pp. 809–816, Nov. 1971.
- [15] C. Y. Doronin, R. K. Chernova, and N. N. Gusakova, "4-Dimethylaminocinnamaldehyde As a Photometric Reagent for Primary Aromatic Amines," *J. Anal. Chem.*, vol. 59, no. 4, pp. 335–344, Apr. 2004.
- [16] S. Crunaire, P. R. Marcoux, L.-H. Guillemot, K.-Q. Ngo, F. Mallard, J.-P. Moy, and T.-H. Tran-Thi, "Discriminating Bacteria With Functionalised Nanoporous Xerogels," *Procedia Chem.*, vol. 6, pp. 125–131, 2012.
- [17] S. G. Schulman and A. C. Capomacchia, "The acidity dependence of the fluorescence of  $\beta$ -naphthylamin," *Spectrochim. Acta Part Mol. Spectrosc.*, vol. 28, no. 1, pp. 1–4, Jan. 1972.
- [18] M. A. El-Bayoumi, J. P. Dalle, and F. O'Dwyer, "Fluorescence lifetimes of molecules that undergo large configurational changes upon excitation," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 92, no. 11, pp. 3494–3495, Jun. 1970.



## Chapitre 4. Détection de phénols volatils exogènes

---

<b>CHAPITRE 4. DETECTION DE PHENOLS VOLATILS EXOGENES.....</b>	<b>105</b>
1. CHOIX DU COV .....	107
1.1 <i>Caractéristiques physico-chimiques des COV nitrophénols</i> .....	107
1.2 <i>Comparaison de l'hydrolyse des substrats</i> .....	109
2. SYNTHÈSE ET CARACTÉRISATION DE XÉROGELS POUR LA DÉTECTION DU 2-NITROPHENOL .....	111
2.1 <i>Choix des précurseurs : synthèses des xérogels</i> .....	111
2.2 <i>Choix des précurseurs : caractérisations</i> .....	113
2.2.1 Adsorption-désorption d'azote.....	113
2.2.2 Mesures d'angle de contact.....	114
2.2.3 Dosage Karl-Fischer .....	115
2.2.4 Exposition au 2-nitrophénol .....	117
2.3 <i>Influence du ratio de solvant et de température de séchage sur la capture du 2-nitrophénol</i> .....	118
3. DÉTECTION DU 2-NITROPHENOL DANS UNE MATRICE SIMPLE : L'EAU TAMPONNÉE .....	120
3.1 <i>Accumulation du 2-nitrophénol dans un xérogel</i> .....	121
3.2 <i>Suivi du piégeage de 2-nitrophénol dans l'eau tamponnée à l'aide du montage avec superposition de plusieurs xérogels</i> .....	122
3.2.1 Protocole expérimental .....	122
3.2.2 Détermination de la limite de détection.....	124
3.2.3 Influence du nombre de xérogels sur la limite de détection .....	125
4. DÉTECTION DU 2-NITROPHENOL DANS DES MATRICES COMPLEXES .....	126
4.1 <i>Influence de certains paramètres physico-chimiques du milieu</i> .....	126
4.2 <i>Détection du 2-nitrophénol issu de matrices complexes</i> .....	129
5. SUIVI DE LA PRODUCTION DE 2-NITROPHENOL PAR HYDROLYSE DE SUBSTRATS ENZYMATIQUES DANS DES MILIEUX SIMPLES ....	130
5.1 <i>E. coli et l'enzyme <math>\beta</math>-glucuronidase</i> .....	131
5.2 <i>S. aureus et l'enzyme <math>\alpha</math>-glucosidase</i> .....	134
5.3 <i>Salmonella et l'enzyme <math>C_8</math>-estérase</i> .....	138
5.3.1 Dissolution du substrat $C_8$ -2-NP.....	138
6.1.1 Test enzymatique $C_8$ -estérase chez plusieurs bactéries .....	140
7. DÉTECTION EN PHASE GAZEUSE DE 2-NITROPHENOL ISSU D'UNE HYDROLYSE ENZYMATIQUE DANS UN MILIEU COMPLEXE .....	141
7.1 <i>Infections du sang et hémoculture</i> .....	141
7.2 <i>Détection de pathogènes dans du sang de cheval défibriné</i> .....	144
7.2.1 Détection d'E. coli dans du sang de cheval .....	144
7.2.2 Détection de S. aureus dans du sang de cheval.....	148
7.3 <i>Détection de pathogènes dans des échantillons alimentaires</i> .....	153
7.3.1 Détection de Salmonella.....	153
7.3.2 Détection de S. aureus.....	160
CONCLUSION .....	162
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	164

Les activités glycosidases ( $\beta$ -glucuronidase,  $\alpha$ -glucosidase) et estérase ( $C_8$ -estérase) ont été choisies pour détecter spécifiquement *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Salmonella enterica*. Pour mettre en évidence ces activités, la liaison spécifique du substrat doit se faire *via* la fonction alcool du COV exogène choisi. Dans un premier temps, nous comparerons les constantes de Henry et les propriétés optiques de deux COV isomères : le 2-nitrophénol et le 4-nitrophénol. Puis, des capteurs sol-gel seront synthétisés et caractérisés. Les capteurs qui auront les meilleures performances seront utilisés pour la détection du COV généré chimiquement ou biologiquement dans des matrices simples puis complexes.

## 1. Choix du COV

### 1.1 Caractéristiques physico-chimiques des COV nitrophénols

Les nitrophénols sont des molécules aromatiques contenant un noyau phénolique et un substituant nitro. Les isomères 2-nitrophénol (2-NP) et 4-nitrophénol (4-NP) sont des COV exogènes de choix pour trois raisons :

- Ils ont des **constantes de Henry** ( $H_{cc}$ ) relativement élevées, ce qui assure une concentration non négligeable dans le volume mort (*headspace*) au-dessus d'une solution aqueuse.
- Ces deux molécules sont **intrinsèquement absorbantes** dans le visible, ce qui permet une détection en absorbance sans molécule sonde. Elles possèdent chacune une forme acide et une forme basique qui absorbent à deux longueurs d'onde différentes (Figure 4.1).
- De nombreux **substrats enzymatiques commerciaux** qui libèrent ces composés sont disponibles.

Les propriétés physico-chimiques des deux isomères sont présentées dans le Tableau 4.1. La constante de Henry du 2-NP est significativement plus élevée que celle du 4-NP, ce qui signifie que pour une même concentration en phase aqueuse, on trouvera une concentration plus élevée de 2-NP dans la phase gazeuse. Or, le 4-NP a des coefficients d'extinction molaire plus importants, ce qui signifie qu'une concentration moins élevée dans le xérogel sera nécessaire pour qu'un signal d'absorbance soit mesuré. Pour rendre compte de ces deux paramètres, nous utiliserons le facteur  $H_{cc} \cdot \epsilon$ . Ce facteur est proportionnel à la concentration présente en phase gazeuse, donc directement proportionnel à l'absorbance qui sera mesurée dans les xérogels : plus ce facteur est élevé, plus le COV sera aisé à détecter en phase gazeuse.

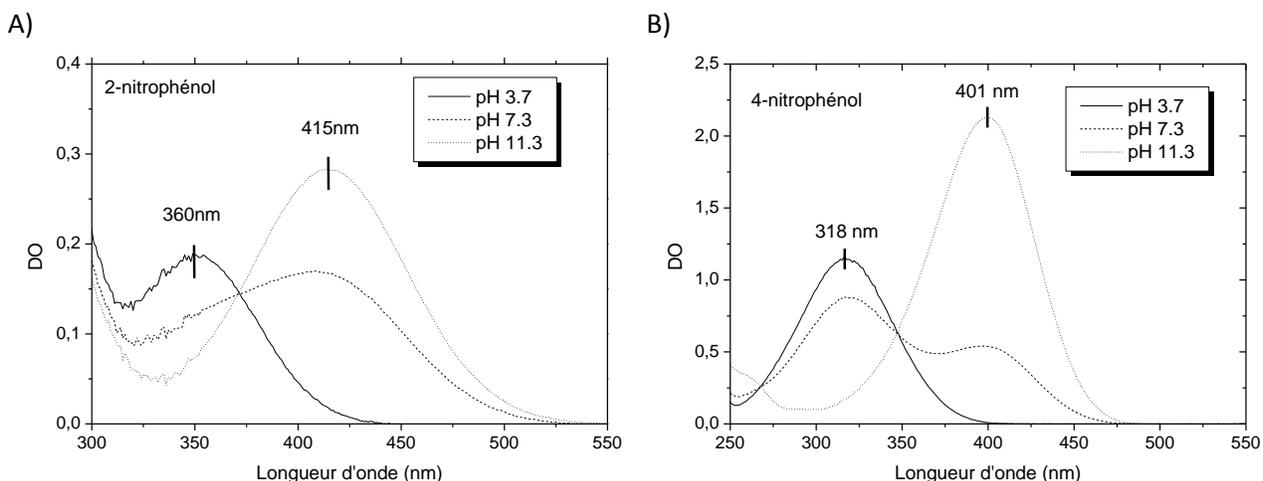


Figure 4.1 : Spectres d'absorbance UV-visible A) du 2-nitrophénol dans l'eau, C = 110 µmol/L, B) du 4-nitrophénol dans l'eau, C = 110 µmol/L

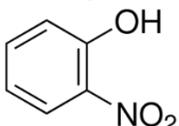
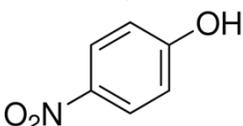
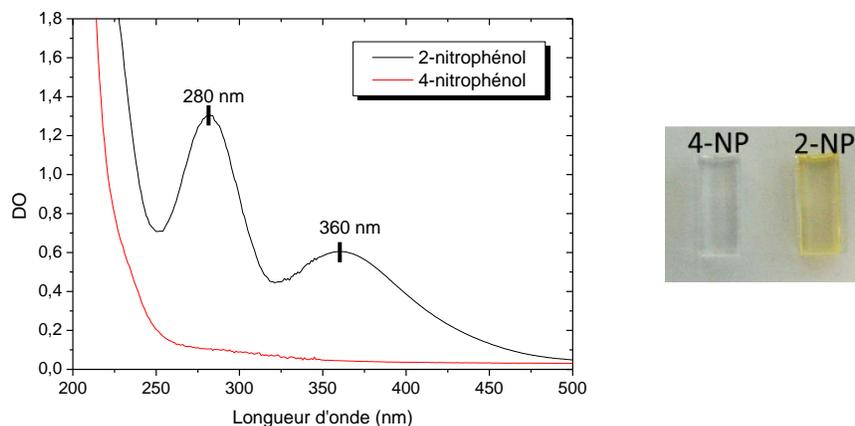
	2nitrophénol 	4-nitrophénol 
<b>pKa</b>	7,2 [1]	7,15 [1][2]
<b>H<sub>cc</sub></b>	$4,85 \cdot 10^{-4}$ [3]	$1,57 \cdot 10^{-8}$ $4,13 \cdot 10^{-5}$ $1,36 \cdot 10^{-6}$ $5,11 \cdot 10^{-7}$ [3]
<b>λ<sub>max</sub></b>	$\lambda_0 = 280$ nm $\lambda_1 = 360$ nm ( $\epsilon = 2400$ L.mol <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup> ) $\lambda_2 = 415$ nm ( $\epsilon = 3500$ L.mol <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup> )	$\lambda_1 = 318$ nm ( $\epsilon = 9\,000$ L.mol <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup> ) $\lambda_2 = 401$ nm ( $\epsilon = 19\,000$ L.mol <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup> ) [2]
<b>H.ε (L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>)</b>	1,70	0,78 (pour H <sub>cc</sub> = $4,13 \cdot 10^{-5}$ ) $2,98 \cdot 10^{-4}$ (pour H <sub>cc</sub> = $1,57 \cdot 10^{-8}$ )

Tableau 4.1 : Propriétés physico-chimiques du 2-nitrophénol et du 4-nitrophénol.

Le facteur  $H_{cc} \cdot \epsilon$  du 4-NP varie entre  $2,98 \cdot 10^{-4}$  et 0,78 en fonction des valeurs de constante de Henry que l'on trouve dans la littérature. Avec un facteur  $H_{cc} \cdot \epsilon$  de 1,70, le 2-NP semble plus avantageux pour une détection en phase gazeuse. Afin de le vérifier simplement, des xérogels ont été placés dans le volume mort au-dessus de solutions aqueuses tamponnées à pH = 6,1, valeur de pH pour laquelle dominant les formes acides (moléculaires) du 2-NP et du 4-NP (1 mmol/L en nitrophénol). Le protocole est détaillé en Annexe 6.4. Après 2h30 d'exposition, le xérogel exposé au-dessus de la solution de 2-NP est devenu jaune alors que celui placé au-dessus de la solution de 4-NP est resté incolore. Les spectres UV-visibles des xérogels (Figure 4.2) confirment cette observation : du 2-NP sous forme protonée ( $\lambda_{max} = 360$  nm) est piégé dans le xérogel.



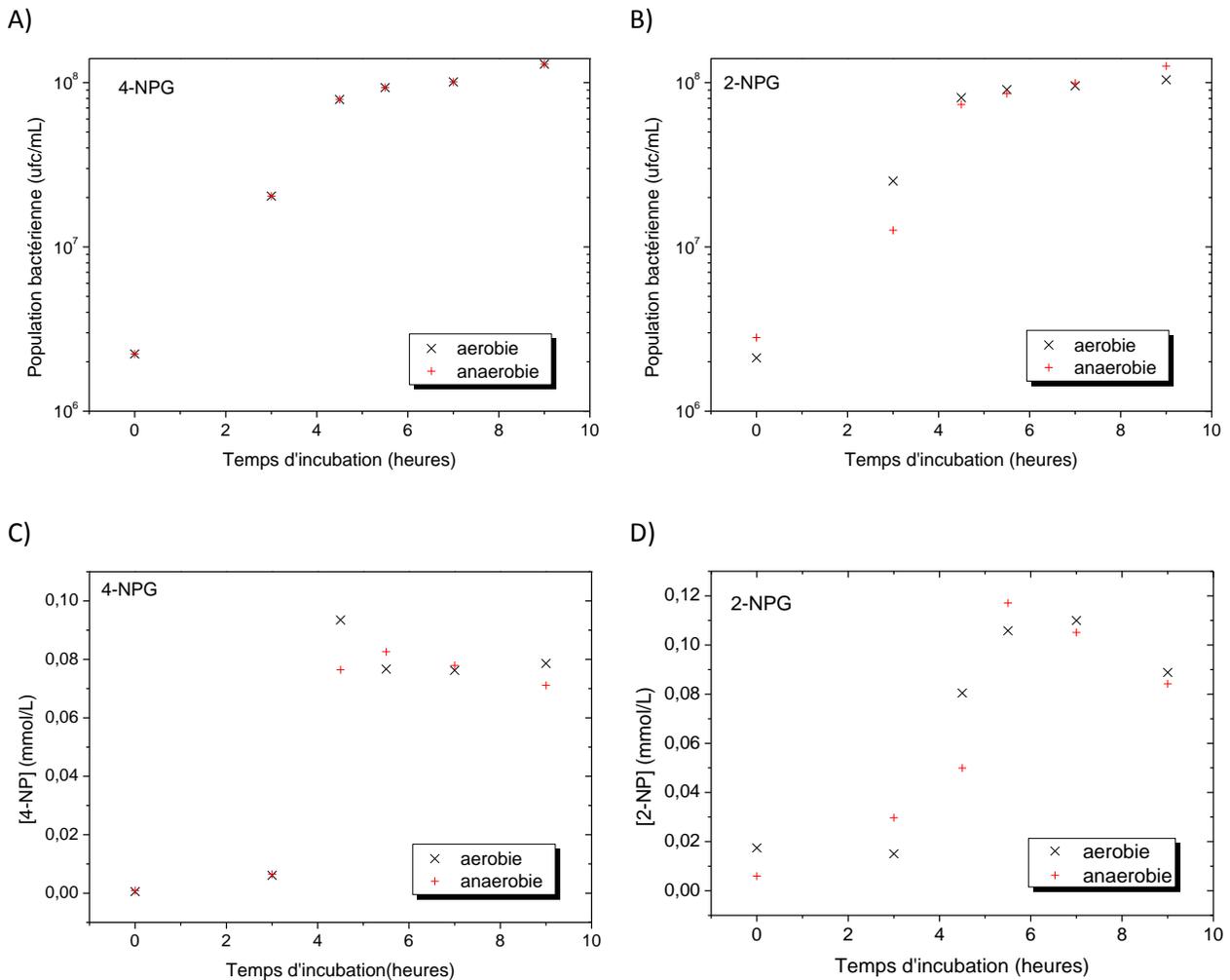
**Figure 4.2 : Spectres UV-visible et photographie des xérogels (TMOS/MeOH/APTES/H<sub>2</sub>O = 1/5/0,03/4, épaisseur 2 mm) après exposition pendant 2h30 à 37°C à des solutions aqueuses de 2-NP et 4-NP (C = 1 mmol/L)**

## 1.2 Comparaison de l'hydrolyse des substrats

Le 2-nitrophénol présente l'avantage d'avoir un facteur  $H_{cc-\epsilon}$  plus élevé que son isomère. Cependant, il est nécessaire de vérifier que les substrats libérant les deux composés sont aussi bien hydrolysés l'un que l'autre. En effet, malgré des propriétés physico-chimiques plus favorables, le 2-nitrophénol ne présenterait pas d'intérêt si le substrat correspondant n'était pas reconnu par les enzymes spécifiques à cause de la position du groupement nitro.

Les vitesses et rendements d'hydrolyse des substrats 2-nitrophényl- $\beta$ -D-glucuronide (2-NPG) et 4-nitrophényl- $\beta$ -D-glucuronide (4-NPG) en présence d'*Escherichia coli* ont donc été comparés en conditions aérobies et anaérobies. La souche utilisée est *Escherichia coli* ATCC 11775, avec une charge bactérienne initiale de  $10^5$  ufc/mL. Le milieu de culture liquide utilisé est détaillé en Annexe 7.4, il contient une concentration en substrat enzymatique de  $113 \mu\text{mol/L}$ . Pour effectuer les cultures en conditions anaérobies, le milieu inoculé est mis en culture dans un flacon fermé par un septum et l'air est remplacé par de l'azote.

Des prélèvements réguliers de 3 mL sont effectués. Sur ces prélèvements, la population bactérienne est suivie (Figure 4.3.A et B) en mesurant la densité optique DO à 550 nm (une densité optique de 0,1 correspond à environ  $2 \cdot 10^7$  ufc/mL avec *E. coli* en phase exponentielle). [4] Puis, la solution est filtrée à  $0,2 \mu\text{m}$  et 30  $\mu\text{L}$  de soude ( $[\text{NaOH}] = 5 \text{ mol/L}$ ) sont ajoutés. Cet ajout de soude a pour objectif de déprotonner tout le nitrophénol libéré afin de pouvoir le quantifier plus facilement par absorbance (à 401 nm pour le 4-nitrophénol et 415 nm pour le 2-nitrophénol), Figure 4.3.C et D.



**Figure 4.3 : A) et B) Suivi de la population bactérienne en présence des substrats 4-NPG et 2-NPG, C) et D) suivi de l'hydrolyse des substrats et de la production de 4-NP et 2-NP dans le milieu de culture.**

Les résultats obtenus en Figure 4.3 montrent que :

- La présence des substrats puis des COV exogènes n'entrave pas la croissance des bactéries
- Les deux substrats sont bien hydrolysés par les bactéries. Dans les deux cas, la concentration en nitrophénol atteint environ 100  $\mu\text{mol/L}$  alors que la concentration initiale en substrat est de 113  $\mu\text{mol/L}$ . On remarque que la concentration en 2-nitrophénol a tendance à diminuer après avoir atteint un maximum, cela peut être dû au passage d'une partie du 2nitrophénol généré en phase gazeuse. D'après la loi de Henry, ce phénomène est d'autant plus important que la concentration est élevée. Ce phénomène n'est pas observé pour le 4-nitrophénol qui présente une constante de Henry au moins 10 fois plus faible.

Cette étude a été réalisée uniquement pour les substrats de la  $\beta$ -glucuronidase, mais elle est rassurante sur le fait que la position du groupement  $\text{NO}_2$  influe peu sur l'activité enzymatique.

Au vu des avantages qu'il présente par rapport à son isomère, **le 2-nitrophénol sera retenu comme COV exogène pour la suite de l'étude.**

## 2. Synthèse et caractérisation de xérogels pour la détection du 2-nitrophénol

Une fois le COV exogène cible choisi, plusieurs xérogels ont été synthétisés pour la capture du 2-nitrophénol. Du fait de leur grande surface développée, des films réalisés par voie sol-gel ont déjà été utilisés pour la détection de composés nitroaromatiques. [5] Dans cet exemple, le film est déposé sur une microbalance à quartz (QCM : Quartz Cristal Microbalance), l'adsorption de nitroaromatiques dans la couche sensible provoque une diminution de la fréquence de résonance. L'affinité chimique des nitroaromatiques pour la couche sensible dépend de la fonctionnalisation de surface de silice : elle est élevée lorsque la densité de groupements silanols qui interagissent avec les cycles aromatiques est importante.

Le cahier des charges pour les capteurs est le suivant :

- une surface développée élevée et des pores suffisamment grands (diamètre > 1 nm) pour accueillir des molécules de 2-nitrophénol ;
- une affinité pour le 2-nitrophénol, qui est une molécule assez hydrophobe (coefficient de partage eau/octanol :  $\log P = 1,7$ ) ;
- un pH intrapore supérieur à 7,2 afin de détecter le 2-nitrophénol sous sa forme déprotonnée c'est-à-dire celle qui a le coefficient d'extinction molaire le plus élevé ( $3500 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  à 415 nm) ;
- être transparent à la longueur d'onde de lecture, à savoir 415 nm pour le 2-nitrophénolate.

Les précurseurs alcoxydes utilisés, les ratios molaires des réactifs et la température de séchage sont les paramètres qui ont été étudiés. Les xérogels obtenus ont été caractérisés par adsorption-désorption d'azote, par dosage Karl-Fischer de l'eau contenue, par mesure de l'angle de contact, et enfin, par exposition au 2-nitrophénol.

### 2.1 Choix des précurseurs : synthèses des xérogels

Le précurseur principal reste le tétraméthylorthosilicate (TMOS), auquel sont ajoutés différents alcoxy-silanes présentés dans le Tableau 4.2. Leurs rôles sont multiples :

- la fonction amine augmente le pH de surface du xérogel afin de déprotonner le nitrophénol piégé (le pKa d'une amine primaire en bout de chaîne alkyle est d'environ 10,5) ;

- la chaîne carbonée augmente la taille des pores (fonction porogène) et apporte un caractère hydrophobe dans le but d'augmenter l'affinité pour le 2-nitrophénol qui a un logP positif (logP = 1,7). [6]

Le FTMOS est employé en supplément d'un alcoxy silane aminé afin d'augmenter le caractère hydrophobe.

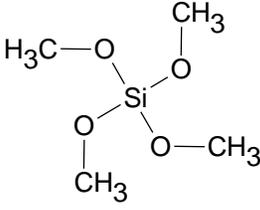
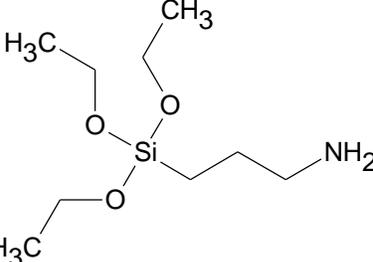
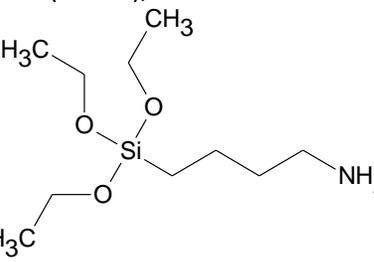
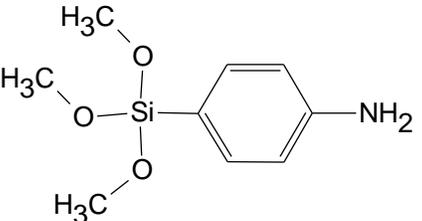
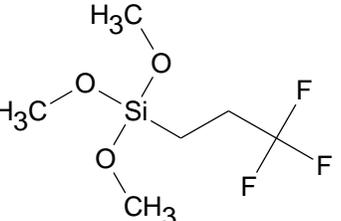
<p>Tétraméthylorthosilicate (TMOS), CAS 681-84-5</p> 	<p>3-aminopropyltriéthoxysilane (APTES), CAS 919-30-2</p> 	<p>4-aminobutyltriéthoxysilane (ABTES), CAS 3069-30-5</p> 
<p>p-aminophenyltriméthoxysilane (PhTMOS), CAS 2996-92-1</p> 	<p>Triméthoxy(3,3,3-trifluoropropyl)silane (FTMOS), CAS 429-60-7</p> 	

Tableau 4.2 : Silanes fonctionnalisés étudiés dans la mise au point de la composition chimique des xérogels

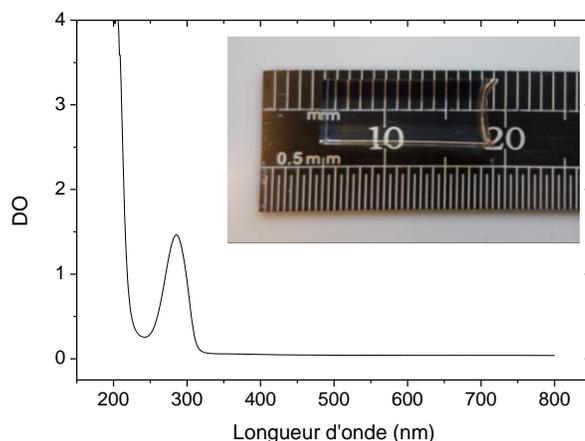
**3-aminopropyltriéthoxysilane (APTES)** Trois types de xérogels ont été synthétisés. Les ratios molaires sont les suivants : TMOS/MeOH/APTES/H<sub>2</sub>O = 1/5/X/4, avec X = 0,03, X = 0,06 ou X = 0,08. Les synthèses sont réalisées à -20°C (bain éthanol/azote liquide) afin de ralentir la réaction de gélification qui est catalysée par la fonction amine de l'APTES. Les réactifs sont introduits dans l'ordre suivant : méthanol, TMOS, APTES et eau. 1 mL de sol est versé dans des cuves en plastique de spectrophotométrie (EVERGREEN). Le sol gélifie d'autant plus vite que la quantité d'APTES est importante : de 3 minutes à quelques secondes à -20°C. Les cuves sont fermées par un film adhésif poreux (Dominique Dutscher AB0718). La synthèse est détaillée en Annexe 3.4.1.

**4-aminobutyltriéthoxysilane (ABTES)** Six types de xérogels ont été synthétisés. Les ratios molaires sont les suivants : TMOS/MeOH/ABTES/H<sub>2</sub>O = 1/5/X/4, avec X variant entre 0,03 et 0,2. Le protocole suivi est le même que pour les gels contenant de l'APTES (Annexe 3.4.2).

**p-aminophenyltriméthoxysilane (PhTMOS)** Trois types de xérogels ont été synthétisés. Les ratios molaires sont les suivants : TMOS/MeOH/PhTMOS/H<sub>2</sub>O = 1/5/X/4, avec X = 3.10<sup>-5</sup>, X = 6.10<sup>-5</sup> ou X = 8.10<sup>-5</sup>. Au-delà de ces concentrations, les gels deviennent brun foncé du fait de la forte absorption dans le visible du précurseur PhTMOS. La synthèse est détaillée en Annexe 3.4.3.

**APTES et FTMOS** Pour maintenir le caractère basique nécessaire à la déprotonation des nitrophénols capturés, tout en augmentant le caractère hydrophobe du xérogel final, on a ajouté du FTMOS à un gel contenant de l'APTES, en vue de réduire la quantité d'eau adsorbée dans les pores. Le ratio molaire d'APTES est fixé à 0,03 et le ratio de FTMOS varie entre 0,0025 et 0,06. Les quantités de réactifs sont détaillées en Annexe 3.4.4.

Après séchage, les gels se sont rétractés d'un facteur 2 dans toutes les dimensions et les xérogels obtenus sont des parallélépipèdes avec les dimensions suivantes : 2 mm x 5 mm x 1,25 mm. Ils sont transparents dans le visible, notamment à 415 nm (Figure 4.4).



**Figure 4.4 : Spectre d'absorbance UV-visible et photographie d'un xérogel TMOS/MeOH/ABTES/H<sub>2</sub>O = 1/10/0,15/4 de 2 mm d'épaisseur.**

## 2.2 Choix des précurseurs : caractérisations

### 2.2.1 Adsorption-désorption d'azote

Les surfaces spécifiques et distributions de tailles de pores ont été mesurées par adsorption-désorption d'azote à 77 K après un dégazage des xérogels à 80°C pendant 48 heures. Les isothermes sont acquises pour des pressions relatives entre  $10^{-6}$  et 1. Les surfaces spécifiques ont été déduites en utilisant la méthode de Brunauer, Emmet et Teller (BET) et les répartitions de la taille des pores sont déterminées à l'aide de la théorie de la fonctionnelle de densité (DFT) (Tableau 4.3). Ces techniques sont détaillées dans l'Annexe 4.

Les xérogels qui développent la plus grande surface spécifique sont ceux contenant l'APTES. Avec l'ABTES qui a un carbone de plus dans sa chaîne alkyle, la surface spécifique est considérablement diminuée et les pores sont en moyenne un peu plus larges, ce phénomène peut être attribué à la gêne stérique provoquée par la chaîne alkyle lors de la gélification. Cependant, ce phénomène n'est pas observé lorsque le précurseur contient une fonction aminophényle qui est pourtant encombrante. Avec cet alcoxyasilane, deux populations de pores sont observées : avec des diamètres entre 5 et 10 Å et entre 25 et 50 Å. Enfin, l'ajout de FTMOS dans des gels contenant de l'APTES a pour conséquence un élargissement des pores jusqu'à 100 Å.

Xérogel	Surface BET (m <sup>2</sup> /g)	Volume poreux total (cm <sup>3</sup> /g)	Diamètre des pores (Å)
APTES 0,03	477	0,305	25-50
APTES 0,06	562	0,369	23-50
APTES 0,08	492	0,330	23-50
ABTES 0,03	270	0,276	20-70
ABTES 0,06	313	0,248	20-80
ABTES 0,08	335	0,253	20-50
ABTES 0,15	332	0,203	20-50
PhTMOS 3.10 <sup>-5</sup>	443	0,279	5-10 et 25-50
PhTMOS 6.10 <sup>-5</sup>	469	0,284	5-10 et 20-50
APTES 0,03 + FTMOS 0,02	362	0,284	5-10 et 20-100
APTES 0,03 + FTMOS 0,04	350	0,254	5-10 et 20-100
APTES 0,03 + FTMOS 0,06	350	0,253	5-10 et 20-100

**Tableau 4.3 : Récapitulatif des xérogels analysés par adsorption-désorption d'azote à 77K.**

### 2.2.2 Mesures d'angle de contact

Des mesures d'angle de contact apportent des informations sur l'affinité des xérogels pour l'eau. A priori, les xérogels qui auront l'angle de contact le plus élevé, donc moins d'affinité pour l'eau, seront plus efficaces pour la capture du 2-nitrophénol. La mesure est effectuée à l'aide d'un Digidrop (Scientific Instruments); une goutte d'eau de volume 1,5 µL est déposée (Figure 4.5).

Les xérogels qui contiennent peu d'alcoxysilane aminé sont très hydrophiles, la goutte d'eau s'étale et les angles mesurés sont inférieurs à 15°. Les xérogels contenant de grandes quantités d'ABTES ou de FTMOS sont ceux qui ont un angle de contact le plus élevé, mais c'est l'ABTES en particulier qui permet d'atteindre les valeurs les plus hautes : au-delà de 80° dès X>0,08 et jusqu'à 89° pour X=0,15.

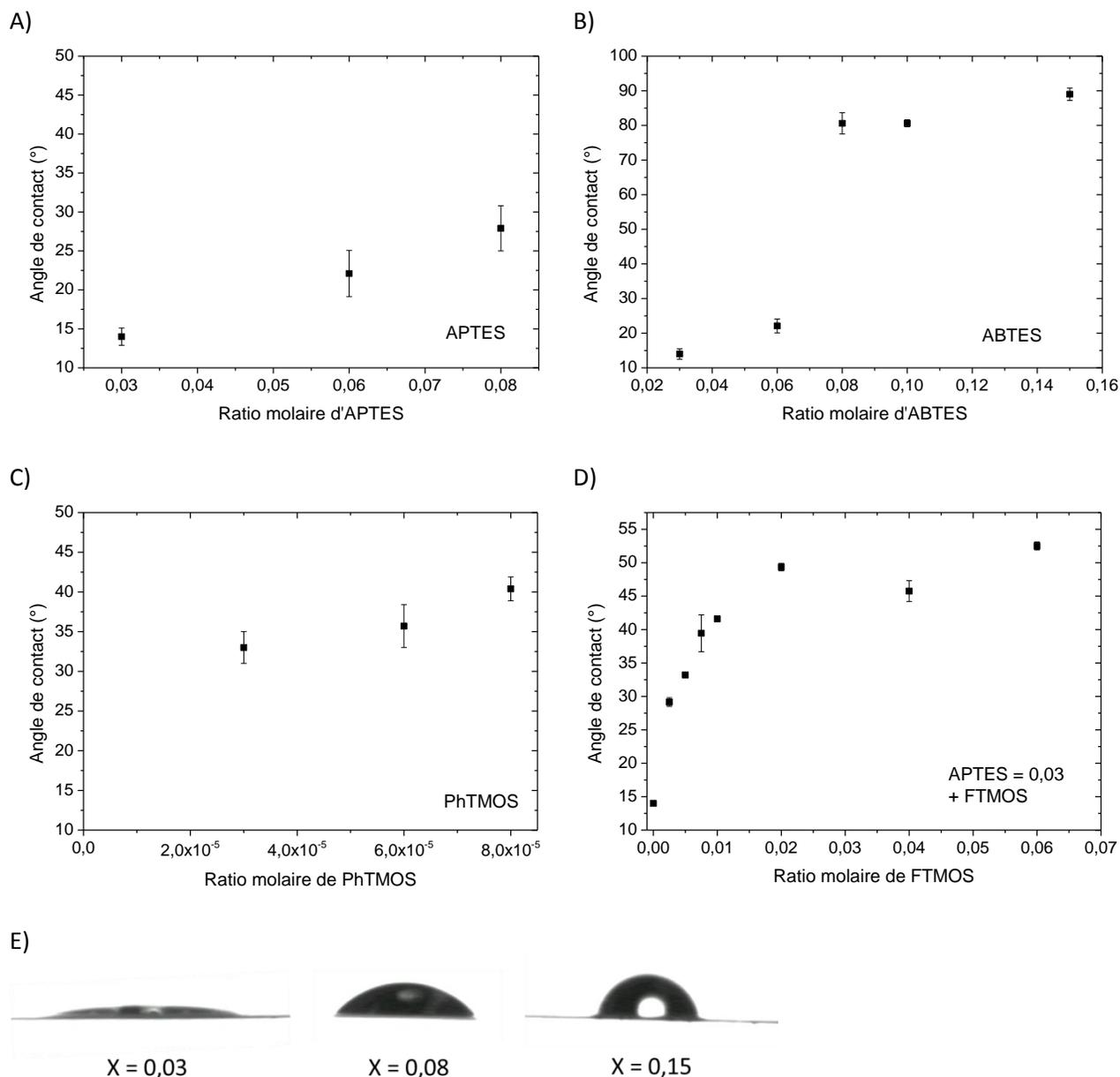
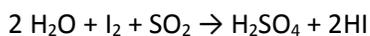


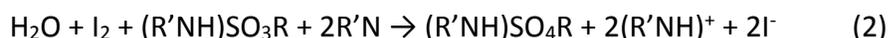
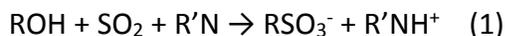
Figure 4.5 : Angles de contact mesurés sur des xérogels contenant différents précurseur alcoxy-silanes.

### 2.2.3 Dosage Karl-Fischer

Le dosage de l'eau contenue dans les xérogels par la méthode Karl-Fischer permet de quantifier l'eau adsorbée par les xérogels lorsqu'ils sont en équilibre avec une atmosphère humide. Cette méthode est basée sur la réaction dite de Bunsen entre de diiode et le dioxyde de soufre en présence d'eau :

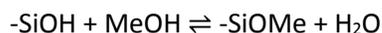


Historiquement utilisée pour le dosage du dioxyde de soufre, cette réaction a été transposée par Karl Fischer pour doser l'eau en milieu organique (équation 2). Ce dosage repose sur deux réactions successives :



En général, l'amine R'N utilisée est la pyridine ou l'imidazole et l'alcool ROH est le méthanol. L'appareil utilisé est un Cou-Lo Compact (GR Scientific), permettant de procéder à des dosages coulométriques. Dans ce mode de dosage, le diiode, I<sub>2</sub>, participant à la réaction est générée directement dans la cellule au fur et à mesure du titrage par une réduction d'iodure. Selon l'équation 2, le diiode réagit quantitativement avec l'eau. La quantité d'eau est calculée à partir de la quantité d'électricité nécessaire pour former le diiode.

Lors du dosage Karl-Fischer, le choix du solvant est important. Les réactifs les plus couramment utilisés sont à base de méthanol et imidazole (Hydranal Coulomat A et Hydranal Coulomat CG, Sigma Aldrich). Cependant, les silanols ont tendance à réagir avec le méthanol pour former un alkoxyde selon le schéma ci-dessous (réaction d'alkoxylation) : [7]



Cette réaction secondaire génère de l'eau. Elle contribue donc à en surestimer la quantité présente dans les échantillons. Pour l'éviter, le fournisseur de l'appareil Karl Fischer conseille l'utilisation de réactifs dans lesquels le méthanol est remplacé par un mélange de 2-méthoxyéthanol et de chloroforme (Hydranal Coulomat AK et Hydranal Coulomat CGK, Sigma Aldrich). La différence entre les teneurs en eau déterminées avec le réactif A-CG et avec le réactif AK-CGK doit permettre d'évaluer le nombre de silanols de surface. [7][8][9] En effet comme le montre la réaction ci-dessus, le Coulomat A-CG génère autant de molécules d'eau supplémentaires que le nombre de silanols libres.

Le protocole est détaillé en Annexe 5. Des mesures ont été réalisées sur certains xérogels broyés, séchés puis exposés à l'air ambiant pendant 5 minutes (humidité relative 53%, température 22°C).

Le Tableau 4.4 détaille les quantités d'eau adsorbées. En valeur absolue, le xérogel avec un ratio d'APTES de 0,03 est celui qui a capté la plus grande quantité d'eau, et le xérogel avec un ratio d'ABTES de 0,15 est celui qui en a capté la plus faible quantité. Ces résultats semblent en accord avec les valeurs d'angles de contact obtenues : les xérogels avec l'angle de contact le plus faible sont aussi ceux qui contiennent la quantité d'eau la plus élevée. Cependant, les xérogels n'ont pas tous le même volume poreux disponible pour l'eau. Les quantités d'eau rapportées au volume poreux ne montrent pas de différence significative, excepté pour le xérogel contenant les groupements fluorés du FTMOS pour lequel l'eau occupe une fraction de volume poreux plus faible.

Le nombre de silanols par unité de surface a été estimé en faisant la différence entre la quantité d'eau mesurée avec le réactif A-CG et celle mesurée avec le réactif AK-CGK. La littérature rapporte des concentrations plus élevées, de l'ordre de 5-6 Si-OH/nm<sup>2</sup> pour des gels de silice pure (sans silanes fonctionnalisés). [10] Il est important de noter que la réaction d'alkoxylation a lieu uniquement pour les silanols accessibles au méthanol et la réaction est souvent incomplète, ce qui revient à en sous-estimer le nombre. [8] Dans nos matériaux, de nombreux groupements carbonés (aminopropyl,

aminobutyl ou trifluoropropyl) peuvent aussi encombrer les pores et gêner l'accès du réactif Karl-Fisher aux silanols.

Xérogel	Angle de contact (°)	Eau adsorbée (mg/g de solide)	Fraction du volume poreux occupé par l'eau	n(Si-OH)/nm <sup>2</sup>
APTES 0,03	14	61	20 %	0,57
ABTES 0,1	80	28	10 %	0,31
ABTES 0,15	87	13	4 %	0,78
APTES 0,03 + FTMOS 0,06	52	29	18 %	0,45

**Tableau 4.4 : quantité d'eau adsorbée dans les xérogels dans une atmosphère à 53% d'humidité (T=22°C), mesurée avec le réactif AK-CGK. Les concentrations en silanols sont calculées en faisant la différence entre les mesures réalisées avec les réactifs A-CG et AK-CGK.**

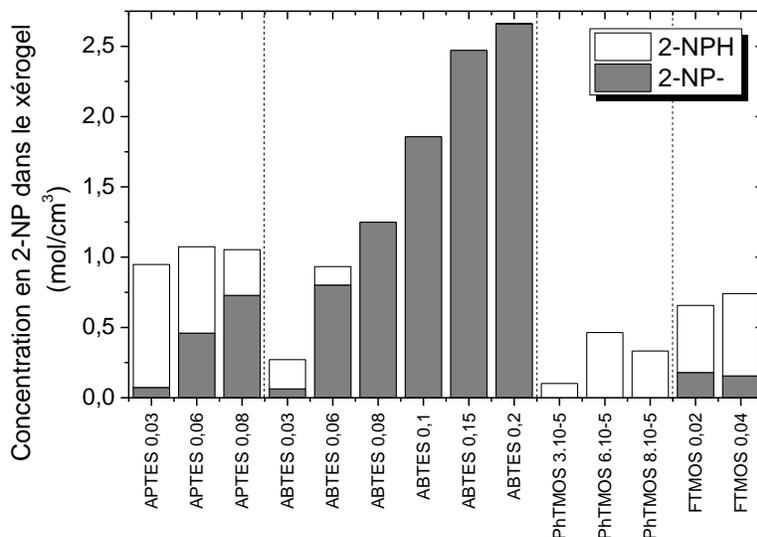
D'autres méthodes peuvent être utilisées pour le dosage de l'eau dans les xérogels comme la spectroscopie d'absorbance dans le proche Infra-Rouge : l'adsorption d'eau modifie l'intensité des bandes d'absorbance des silanols à 1440, 1980 et 2300 nm. [11] L'analyse thermogravimétrique (ATG) est aussi un moyen de mesurer la quantité d'eau dans les xérogels : jusqu'à 150°C, l'eau moléculaire physisorbée par liaison hydrogène est éliminée. Au-delà de cette température, les groupes silanols condensent entre eux en libérant une molécule d'eau, ce qui permet d'en estimer le nombre en mesurant la perte de masse à partir de 150°C. [9] Cependant, dans le cas de matrices hybrides avec des groupements organiques, la décomposition des chaînes carbonées s'ajoutera à la perte de masse due à la condensation des silanols.

#### **2.2.4 Exposition au 2-nitrophénol**

La dernière technique de caractérisation est une simple exposition au-dessus d'une solution aqueuse de 2-nitrophénol tamponnée. Le protocole utilisé est décrit en Annexe 6.4. Le xérogel est placé au-dessus de 5 mL de solution à 1 mmol/L de 2-nitrophénol tamponnée à pH = 6,1 (acide 2-morpholinoéthanesulfonique, MES, 0,15 mol/L), à 37°C, pendant 2 heures.

Un spectre UV-visible des xérogels est mesuré avant et après l'exposition. Pour estimer la concentration de 2-nitrophénol sous forme moléculaire et déprotonnée dans le xérogel, le spectre UV-visible avant exposition est soustrait et les pics à 360 nm (2-NPH) et 415 nm (2-NP<sup>-</sup>) sont déconvolués (Annexe 6.2).

Sur la Figure 4.6, la concentration totale en 2-nitrophénol dans les xérogels (en mol/cm<sup>3</sup>) est donnée par la hauteur des bâtons. La partie blanche représente la quantité de 2-nitrophénol moléculaire (2-NPH) et la partie grise représente la quantité de 2-nitrophénol déprotonné (nitrophénolate 2-NP<sup>-</sup>). Les capteurs présentant la plus grande quantité de 2-NP<sup>-</sup> seront préférés car cette forme absorbe à une longueur d'onde plus proche du visible et avec un coefficient d'extinction molaire plus élevé que celui de la forme moléculaire 2-NPH.



**Figure 4.6 : Quantités de 2-nitrophénol capturées par des xérogels de compositions diverses lors d'une exposition à une atmosphère en équilibre avec une solution aqueuse tamponnée (MES, pH 6,1) de 2-NP 1 mmol/L (2 heures d'exposition à 37°C,).**

Les capteurs contenant de l'aminophényltriméthoxysilane (PhTMOS) ne déprotonnent pas du tout le 2-NP. Si on suppose que le  $pK_a$  de la fonction amine de cet alcoxyasilane est proche de celui de l'aniline ( $pK_a = 4,6$ ) il est alors inférieur à celui de du 2-NP ( $pK_a = 7,2$ ), ce qui explique que la déprotonation du 2-NP n'ait pas lieu dans ces capteurs.

Malgré leur caractère hydrophobe et une grande surface spécifique, les xérogels contenant du FTMOS ne piègent pas mieux le COV que ceux sans FTMOS.

Enfin, à quantités égales, l'ABTES déprotonne plus facilement le 2-NP que l'APTES. **Les xérogels contenant de grandes quantités d'ABTES sont ceux qui piègent le plus de 2-nitrophénol sous forme phénolate.** Or, plus la quantité de silane aminé est importante, plus la réaction d'hydrolyse des silanes est catalysée. Ainsi, les sols contenant de grandes quantités d'ABTES gélifient très rapidement (en moins d'une minute à  $-20^\circ\text{C}$ , et en quelques secondes à température ambiante), ce qui rend la mise en forme difficile. Une dilution par ajout de solvant (ici le méthanol) peut permettre de ralentir la vitesse de gélification.

### 2.3 Influence du ratio de solvant et de température de séchage sur la capture du 2-nitrophénol

Après la composition des gels, nous nous sommes intéressés à l'influence de la température de séchage et de la quantité de solvant utilisée, à savoir le méthanol.

En augmentant le ratio molaire de solvant, de 5 à 10, l'objectif est **de ralentir la gélification grâce au phénomène de dilution.** En effet, pour un gel TMOS/MeOH/ABTES/H<sub>2</sub>O = 1/5/0,15/4, le temps de gélification à  $-20^\circ\text{C}$  est de moins d'une minute, alors qu'il est de 10 minutes pour un gel contenant deux fois plus de solvant : TMOS/MeOH/ABTES/H<sub>2</sub>O = 1/10/0,15/4. Cela autorisera des ratios élevés

d'ABTES dans les gels, tout en disposant d'un temps de gélification suffisamment élevé pour avoir le temps de couler le sol dans les cuves de spectrophotométrie.

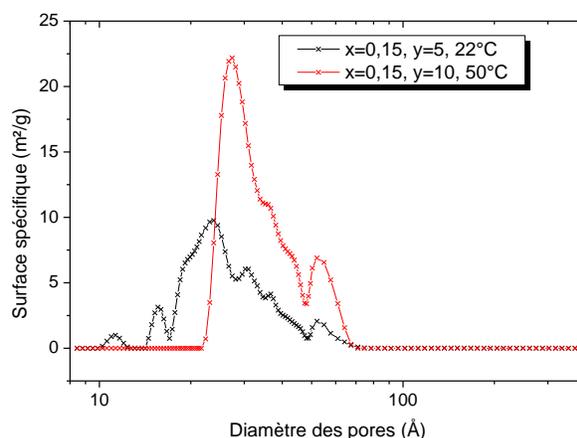
L'augmentation de la température de séchage de 22°C à 50°C a pour but **d'accélérer le séchage des gels et d'augmenter le volume poreux** : en éliminant rapidement le solvant, on espère éviter les condensations entre silanols voisins et limiter ainsi le rétreint du gel.

**Adsorption-désorption d'azote** Les xérogels obtenus avec un séchage à 50°C et un ratio de méthanol élevé ont subi un dégazage à 80°C pendant 48 heures, puis ont été caractérisés par adsorption-désorption d'azote à 77 K. En augmentant simultanément la température de séchage à 50°C et le ratio molaire de méthanol à 10, la surface spécifique et le volume poreux sont multipliés par deux et le diamètre des pores est augmenté (Figure 4.7).

A)

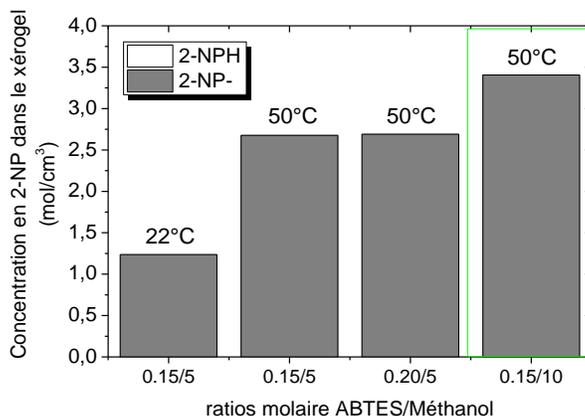
Xérogel	MeOH 5 22°C	MeOH 10 50°C
Surface BET (m <sup>2</sup> /g)	332	612
Volume poreux (cm <sup>3</sup> /g)	0,203	0,395

B)



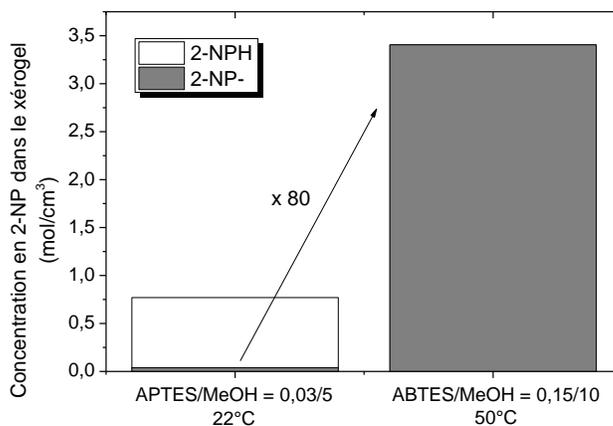
**Figure 4.7 : A) Surfaces spécifiques et volumes poreux mesurés par adsorption-désorption d'azote pour des xérogels avec un ratio molaire d'ABTES de 0,15. B) Distribution de la taille des pores dans les xérogels (x ratio molaire d'ABTES ; y ratio molaire de MeOH).**

**Exposition au 2-nitrophénol** Afin de voir si cette augmentation du volume poreux permet de capturer une plus grande quantité de 2-NP, les xérogels obtenus ont été exposés au-dessus d'une solution aqueuse de 2-NP 1 mmol/L (1 heure d'exposition à 37°C, Figure 4.8). Pour des xérogels de même composition (de ratio molaire ABTES/MeOH = 0,15/5), la quantité de 2-nitrophénolate capturée est multipliée par 2,2 lorsque la température de séchage passe de 22°C à 50°C. A température de séchage donnée, 50°C, l'augmentation du ratio d'ABTES à 0,2 ne change pas l'affinité pour le 2-nitrophénol. En revanche, en portant le ratio molaire de méthanol de 5 à 10, la quantité de phénolate capturé est accrue.



**Figure 4.8 : Quantités de 2-nitrophénol capturé par des xérogels lors d’une exposition à une atmosphère en équilibre avec une solution aqueuse de 2-NP 1 mmol/L tamponnée à pH = 6,1 avec du MES (1 heure d’exposition à 37°C).**

Pour la suite de l’étude, nous retiendrons donc les xérogels contenant les ratios molaires suivants :  $\text{TMOS/MeOH/ABTES/H}_2\text{O} = 1/10/0,15/4$  avec un séchage à 50°C. Par rapport à la formulation initialement employée en début de thèse, à savoir  $\text{TMOS/MeOH/APTES/H}_2\text{O} = 1/5/0,03/4$  séchée à 22°C, on peut ainsi capturer en 1h d’exposition environ 80 fois plus de 2-NP (Figure 4.9).



**Figure 4.9 : Quantités de 2-nitrophénol capturé par des xérogels lors d’une exposition à une atmosphère en équilibre avec une solution aqueuse de 2-NP 1 mmol/L tamponnée à pH = 6,1 avec du MES (1 heure d’exposition à 37°C).**

### 3. Détection du 2-nitrophénol dans une matrice simple : l’eau tamponnée

L’application visée pour nos capteurs est la détection de micro-organismes dans des échantillons complexes (sang, exsudat, matrices alimentaires, etc.). Dans ce type de milieux, plusieurs paramètres physico-chimiques peuvent avoir une influence sur le transfert de masse liquide-gaz du 2-NP, comme la présence de colloïdes ou d’amphiphiles. Dans un premier temps, les capteurs sont testés vis-à-

vis d'atmosphères de 2-nitrophénol générées à partir de solutions aqueuses simples. Dans un deuxième temps, les atmosphères sont générées à partir de matrices complexes du point de vue physico-chimique, telles que du lait ou du sang.

### 3.1 Accumulation du 2-nitrophénol dans un xérogel

Un xérogel de formulation TMOS/MeOH/ABTES/H<sub>2</sub>O = 1/10/0,15/4 séché à 50°C, de 0,8 mm d'épaisseur est placé au-dessus d'une solution de 2-NP tamponnée à pH = 6,1 (acide 2-morpholinoéthanesulfonique, MES, 0,15 mol/L) à 37°C pendant 16 heures. La concentration en 2-nitrophénol dans la solution est de 1 µmol/L. Des spectres UV-visible du xérogel sont acquis avant et après l'exposition.

A cette concentration, l'absorbance théorique de la solution dans une cuve de spectrophotométrie de dimension L = 1 cm est de  $A = \epsilon \cdot L \cdot C = 2,4 \cdot 10^{-3}$  (avec  $\epsilon = 2400 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ , pour le 2-NP sous sa forme moléculaire, majoritairement présente à pH = 6,1). Or, nous avons calculé la limite de détection du spectrophotomètre utilisé (Annexe 10.1). Cette limite de détection est de  $4,9 \cdot 10^{-3}$ , **une concentration aussi faible de 2-nitrophénol ne peut donc pas être mise en évidence par simple spectrophotométrie de la phase aqueuse.**

Après 16 heures d'exposition, le spectre du xérogel présente un pic à 415 nm (Figure 4.10), l'absorbance à cette longueur d'onde a augmenté de  $5,8 \cdot 10^{-3}$ , signe de l'adsorption de 2-nitrophénol. Grâce à cette valeur, il est possible de déterminer la quantité de 2-nitrophénol piégé en posant deux hypothèses :

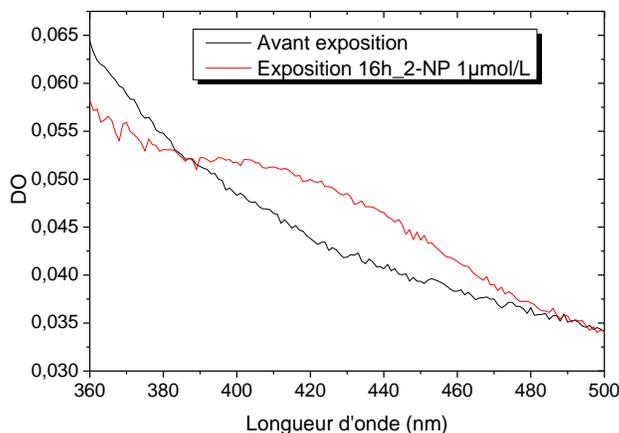
- Le 2-nitrophénol est réparti de manière homogène dans le xérogel
- le coefficient d'extinction molaire du 2-nitrophénol sous sa forme déprotonnée est le même en solution et dans le xérogel, à savoir  $3500 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

Il est alors possible de calculer la concentration en 2-NP dans le xérogel :

$$C_{2-NP, \text{xérogel}} = \frac{A}{\epsilon \cdot L} = 2,07 \cdot 10^{-5} \text{ mol} / \text{L} \text{ (Avec } \epsilon = 3500 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}, L = 0,08 \text{ cm et } A = 5,8 \cdot 10^{-3})$$

Cette expérience nous a permis de montrer que **le capteur joue bien son rôle de concentrateur** puisque la concentration a été augmentée d'un facteur  $\frac{C_{2-NP, \text{xérogel}}}{C_{2-NP, \text{aq}}} = 21$  entre la phase aqueuse et la phase xérogel.

D'après la loi de Henry, sans xérogel, la concentration en 2-nitrophénol dans la phase gazeuse à l'équilibre aurait été de :  $C_{2-NP, \text{gaz}} = H_{cc} \times C_{2-NP, \text{aq}} = 5,85 \cdot 10^{-10} \text{ mol} / \text{L}$ , soit **14 ppb**. En présence du xérogel la loi de Henry n'est vraisemblablement plus vérifiée car nous sommes en présence de 3 phases pour le 2-NP : la phase aqueuse et la phase gaz, comme précédemment, auxquelles il faut ajouter la phase xérogel (phase adsorbée).



**Figure 4.10 : Spectres UV-visible d'un xérogel de formulation TMOS/MeOOH/ABTES/H<sub>2</sub>O = 1/10/0,15/4 séché à 50°C, avant et après exposition pendant 16 heures à une solution de 2-nitrophénol de concentration 1 µmol/L tamponnée à pH = 6,1.**

Grâce à cette expérience simple, nous avons montré qu'il est possible d'accumuler les COV dans les xérogels de manière à obtenir une concentration plus élevée en phase xérogel qu'en phase aqueuse. Néanmoins, ce phénomène est relativement lent du fait de la diffusion du 2-NP : à la fois dans la phase aqueuse pour rejoindre l'interface eau/air et dans la phase gazeuse pour atteindre le xérogel.

Il est possible d'améliorer le transfert de masse du 2-nitrophénol vers le xérogel notamment en utilisant le montage décrit au chapitre 2 :

- une agitation de la solution permet une meilleure diffusion vers l'interface eau/air,
- un ventilateur accélère le déplacement de molécules de 2-NP gazeux vers le xérogel,
- et la superposition de plusieurs xérogels augmente la surface d'échange gaz/xérogel.

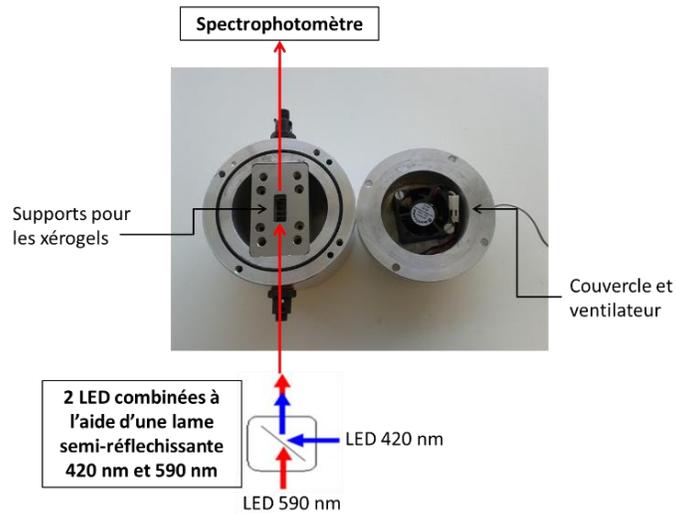
## 3.2 Suivi du piégeage de 2-nitrophénol dans l'eau tamponnée à l'aide du montage avec superposition de plusieurs xérogels

### 3.2.1 Protocole expérimental

Afin d'évaluer la sensibilité de nos capteurs vis-à-vis du 2-nitrophénol, nous avons utilisé le montage décrit au chapitre 2. Dans le réacteur, on introduit 50 mL de solution de 2-nitrophénol tamponnée à pH = 6,1 (acide 2-morpholinoéthanesulfonique, MES, 0,15 mol/L) ; la solution est agitée à l'aide d'un barreau aimanté. Plusieurs xérogels de formulation TMOS/MeOH/ABTES/H<sub>2</sub>O = 1/10/0,15/4 qui ont séché à 50°C, et de 0,8 mm d'épaisseur, sont placés dans le support. Un ventilateur (SUNON MC30150V2-0000-A99) alimenté avec 5 V permet d'homogénéiser la phase gazeuse (Figure 4.11).

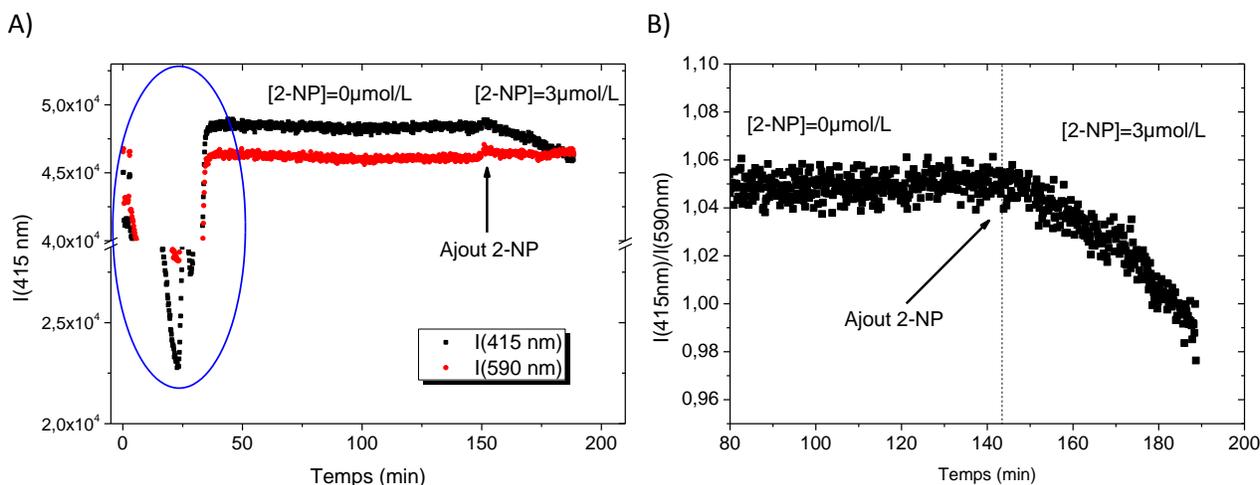
La source de lumière utilisée est une combinaison de deux LEDs. Une LED à 420 nm (Mightex LCS-0420-02-22) permet de suivre l'adsorption de 2-nitrophénol dans les xérogels, et une deuxième à 590 nm (Mightex LCS-0590-03-22) sert de référence. Ces deux LED sont combinées à l'aide d'une lame semi-réfléchissante (Mightex, LCS-BC25-0000). A la sortie des xérogels, la lumière transmise est collectée

par une fibre optique ; les intensités lumineuses à 420 nm et 590 nm sont suivies à l'aide d'un spectrophotomètre portable (Ocean Optics, USB2000+) toutes les 5 secondes.



**Figure 4.11 : Photographie du montage pour le suivi de la capture de 2-nitrophénol dans les xérogels.**

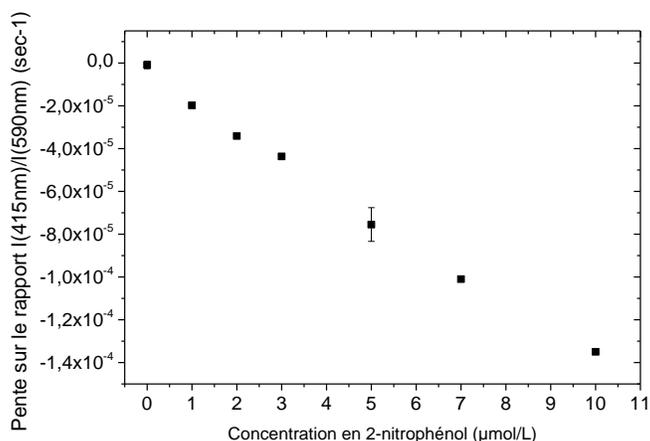
Cinq xérogels sont d'abord placés au-dessus de 50 mL d'eau tamponnée (MES, pH = 6,1). Lors de cette phase, leur transmission diminue à la fois à 415 nm et 590 nm (région entourée en bleu dans la Figure 4.12.A). Nous supposons que ce caractère momentanément diffusant des xérogels est dû à une modulation de l'indice de réfraction. En effet, certains pores se remplissent d'eau alors même que d'autres sont encore remplis d'air, ce qui provoque la diffusion de la lumière visible. [12][13] Cela se traduit par une opacification transitoire des monolithes. Après un certain temps ( $t=40$  min), ces derniers redeviennent transparents et on vérifie sur une période de 100 min que la transmission des xérogels reste constante en l'absence de 2-NP. On ajoute alors, à  $t=142$  min, un faible volume de solution éthanolique concentrée de 2-nitrophénol afin d'obtenir la concentration souhaitée dans la phase aqueuse de 50 mL. Au fur et à mesure que du 2-NP est capturé dans les xérogels, l'intensité lumineuse à 415 nm diminue alors que celle à 590 nm reste constante. Pour rendre compte de cet effet, on reporte la valeur du rapport  $I(415\text{ nm})/I(590\text{ nm})$  au cours du temps (Figure 4.12.B).



**Figure 4.12 :** A) Suivi au cours du temps des intensités à 415 nm et 590 nm transmises à travers les 5 xérogels. Dans un premier temps (cercle bleu), les xérogels absorbent de la vapeur d'eau, puis, après ajout de 2-nitrophénol, l'intensité à 415 nm diminue à cause de l'adsorption de 2-NP. B) Suivi au cours du temps du rapport des intensités à 415 nm et 590 nm.

### 3.2.2 Détermination de la limite de détection

Afin de déterminer quelles concentrations en 2-nitrophénol il est possible de détecter dans la phase aqueuse, avec 5 xérogels adjacents, le dispositif a été testé vis-à-vis de plusieurs concentrations en 2-nitrophénol. Les cinq xérogels sont d'abord mis en présence de 50 mL d'eau tamponnée (pH = 6,1, MES, 0,15 mol/L) pendant une heure afin que la quantité de lumière transmise soit constante. Puis différentes quantités de 2-nitrophénol sont ajoutées afin d'obtenir des concentrations variables. L'intensité à 415 nm diminue à cause du 2-nitrophénolate adsorbé. Pour chaque concentration en 2-nitrophénol aqueux, on relève la pente obtenue sur le rapport  $I(415 \text{ nm})/I(590 \text{ nm})$ . (Figure 4.13).



**Figure 4.13 :** Suivi de la diminution de l'intensité à 415 nm en fonction de la concentration en 2-nitrophénol dans la phase aqueuse.

La limite de détection du dispositif a été estimée en utilisant 5 xérogels, et en répétant les mesures sans 2-nitrophénol et avec des solutions à 5  $\mu\text{mol/L}$  de 2-nitrophénol. La pente sur le rapport  $I(415\text{ nm})/I(590\text{ nm})$  minimale considérée comme détectable est  $3,36 \cdot 10^{-5} \text{ sec}^{-1}$  (Annexe 10.2).

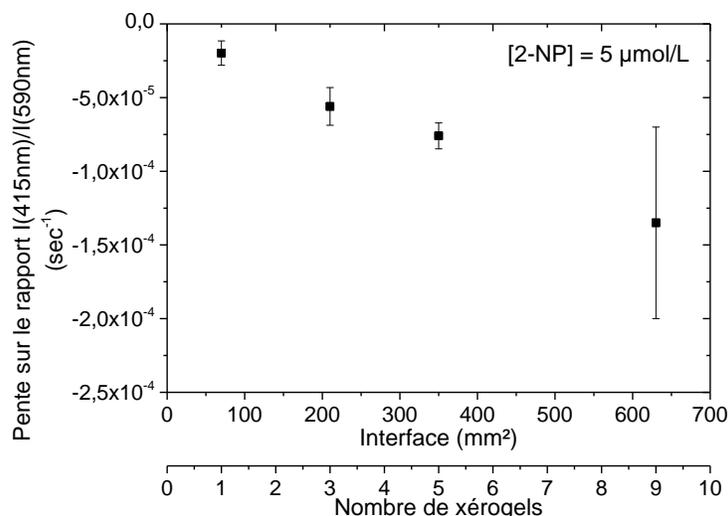
Ainsi, **une concentration aussi faible que 2  $\mu\text{mol/L}$  de 2-nitrophénol dans la phase aqueuse a pu être détectée avec un temps d'accumulation de moins de 10 minutes** dans les xérogels. Sans les xérogels, d'après la loi de Henry, la concentration en phase gazeuse en 2-nitrophénol serait de **28 ppb**. A titre de comparaison, Tait *et al.* se sont aussi intéressés au 2-nitrophénol issu d'une hydrolyse enzymatique. [14] Le 2-nitrophénol généré est capturé et concentré sur une phase solide pendant 10 minutes puis thermo-désorbé et analysé en chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (SPME-GC-MS). La concentration en 2-nitrophénol la plus faible détectée est de 1,7  $\mu\text{g/L}$ , soit 12  $\mu\text{mol/L}$  dans la phase aqueuse, ce qui correspond à 168 ppb en phase gazeuse d'après la loi de Henry. Avec une instrumentation bien moins coûteuse et une technique bien plus simple à mettre en œuvre, nous sommes parvenus grâce aux xérogels et à la transduction optique à une limite de détection beaucoup plus basse.

### **3.2.3 Influence du nombre de xérogels sur la limite de détection**

En multipliant le nombre de xérogels, on augmente la surface d'échange gaz/xérogel où a lieu la capture du 2-nitrophénol (un xérogel correspond à environ 70  $\text{mm}^2$  de surface d'échange, à savoir 2 faces de 35  $\text{mm}^2$ ). *A priori*, en augmentant la surface d'échange, la limite de détection peut être abaissée.

Des mesures ont été réalisées pour 1, 3, 5 et 9 xérogels dans le support. A chaque fois, les xérogels étaient d'abord mis en présence de 50 mL d'eau tamponnée ( $\text{pH} = 6,1$ , MES, 0,15  $\text{mol/L}$ ) pendant une heure afin que la quantité de lumière transmise soit constante. Puis, 25  $\mu\text{L}$  de solution éthanolique de 2-nitrophénol ( $C = 10 \text{ mmol/L}$ ) sont ajoutés afin d'obtenir une concentration de 5  $\mu\text{mol/L}$  dans les 50 mL de solution aqueuse.

Pour une même concentration en 2-NP dans la phase gazeuse (5  $\mu\text{mol/L}$ ), on remarque que la réponse est d'autant plus importante que le nombre de xérogel est important. En effet, il existe un nombre limité de sites d'adsorption à la surface du xérogel. Avec un seul xérogel, ces sites sont rapidement saturés de molécules de 2-NP, il faut ensuite attendre la diffusion de ces molécules vers l'intérieur du xérogel pour libérer les sites d'adsorption à la surface afin d'accueillir de nouvelles molécules de 2-NP. En augmentant le nombre de xérogel, on augmente l'interface gaz/xérogel, donc le nombre de sites d'adsorption.



**Figure 4.14 : Suivi de la capture de 2-nitrophénol en fonction du nombre de xérogels superposés au-dessus d'une solution aqueuse à 5mol/L de 2-nitrophénol.**

Nous avons montré que les xérogels synthétisés ont une grande affinité pour le 2-nitrophénol. Le caractère cumulatif de tels capteurs permet de concentrer le COV pendant l'exposition à une solution aqueuse. Ainsi, un facteur de concentration de plus de 20 a pu être atteint après 16 heures d'exposition. L'augmentation de la surface d'échange gaz/xérogel et l'homogénéisation de la phase gazeuse à l'aide d'un ventilateur permettent d'accélérer ce processus, et 2 µmol/L de 2-nitrophénol dans la phase aqueuse peuvent être détectés en moins de 10 minutes seulement. Avec un protocole utilisant une préconcentration sur phase solide pendant 10 minutes et une analyse en GC-MS, la concentration en 2-nitrophénol la plus faible détectée est de 12,2 µmol/L. [14]

## 4. Détection du 2-nitrophénol dans des matrices complexes

Précédemment, les xérogels ont été exposés à des atmosphères générées par des solutions aqueuses simples de 2-nitrophénol. Or, dans des applications en diagnostic, tant dans le secteur clinique qu'industriel, le 2-nitrophénol sera libéré dans des échantillons complexes (sang, exsudat, matrices alimentaires...). Dans ces milieux complexes, plusieurs paramètres physico-chimiques peuvent avoir une influence sur le transfert du 2-NP en phase gazeuse.

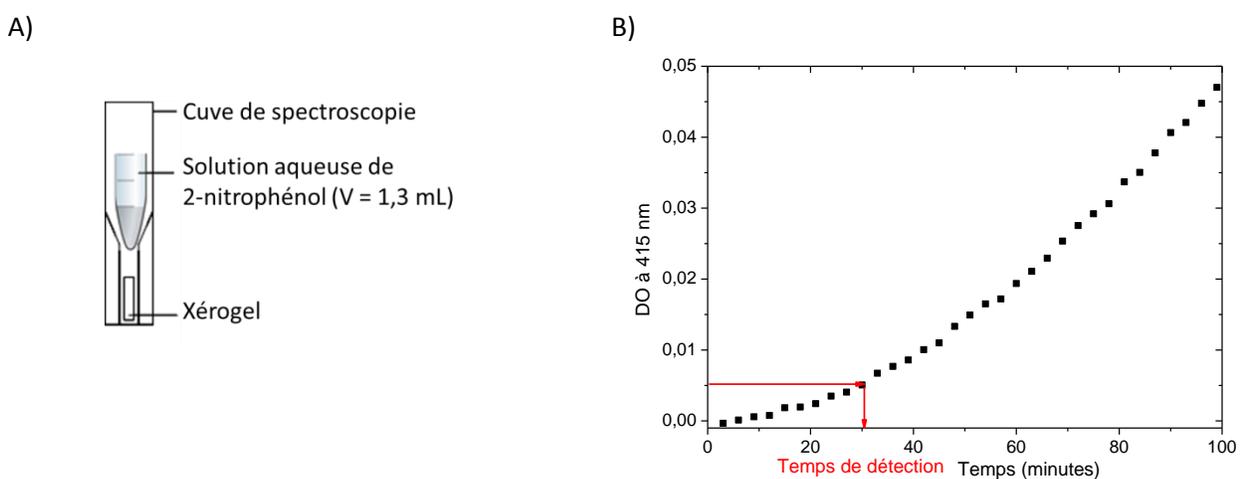
Dans un premier temps, nous évaluerons l'impact de paramètres tels que la salinité ou le pH du milieu. Puis, nous passerons sur des milieux complexes réels tels que le lait et le sang de cheval.

### 4.1 Influence de certains paramètres physico-chimiques du milieu

Six paramètres de la solution aqueuse ont été évalués quant à leur capacité à influencer sur la concentration en 2-NP dans la phase gazeuse : la température, l'agitation de la solution, le pH, la présence d'un co-solvant, la force ionique et la présence d'un amphiphile. Pour ce faire, le montage suivant est utilisé (Figure 4.15.A) :

- un xérogel (TMOS/MeOH/ABTES/H<sub>2</sub>O = 1/5/0,1/4, épaisseur 2 mm) est placé dans le fond d'une cuvette de spectrophotométrie ;
- 1,3 mL de solution aqueuse de 2-NP 1 mmol/L sont placés dans un tube eppendorf, placé lui-même dans la cuvette ;
- la cuvette est fermée hermétiquement et un spectre UV-visible du xérogel est mesuré toutes les 3 minutes.

L'absorbance à 415 nm est ainsi relevée en fonction du temps. Nous notons le temps au bout duquel l'absorbance atteint  $5 \cdot 10^{-3}$ . Cette valeur correspond à la limite de détection de notre spectrophotomètre à 415 nm (la détermination de cette limite est détaillée en Annexe 10.1).



**Figure 4.15 : A) Schéma du montage expérimental utilisé, B) Courbe obtenue donnant l'absorbance du xérogel à 415 nm en fonction du temps d'exposition à la solution aqueuse.**

Les temps de détection obtenus pour chaque condition en solution aqueuse sont détaillés dans les tableaux ci-dessous.

**Température** La température joue un rôle important dans l'équilibre d'un composé entre phase aqueuse et phase gazeuse. Lorsque la température augmente de 10°C, la constante de Henry d'un composé est doublée. [3] Cependant, nous n'avons pas observé de différence majeure dans le temps de détection du 2-nitrophénol.

Condition	T = 22°C	T = 37°C
Temps de détection	25 minutes	26 minutes

**Agitation** Ce sont des molécules qui se situent à l'interface entre solution et gaz qui se volatilisent. Sans agitation, le phénomène de diffusion est le seul qui permette de ré-enrichir l'interface en molécules de 2-nitrophénol. Avec une agitation vigoureuse, le transfert de masse est légèrement plus rapide.

Condition	Sans agitation	Avec agitation vigoureuse
Temps de détection	25 minutes	22 minutes

**pH** Le  $pK_a$  du 2-nitrophénol est de 7,2. En dessous de cette valeur, il se trouve majoritairement sous sa forme moléculaire. Au-dessus de cette valeur, il se présente majoritairement sous sa forme phénolate non volatile. C'est le cas dans la solution tamponnée avec le TAPS à pH = 8,2. Le pH des milieux de culture aura donc une grande importance. Il sera nécessaire de les tamponner à un pH significativement inférieur à 7,2 (typiquement une unité de moins), afin que le 2-nitrophénol soit majoritairement présent sous sa forme moléculaire volatile.

Condition	pH = 5,7 (Tampon MES, 0,15 mol/L)	pH = 6,1 (Tampon MES, 0,15 mol/L)	pH = 8,2 (Tampon TAPS, 0,15 mol/L)
Temps de détection	24 minutes	21 minutes	108 minutes

**Présence d'un co-solvant** L'affinité du 2-nitrophénol n'est pas la même pour tous les solvants. Sa solubilité est plus élevée dans l'éthanol que dans l'eau. Or, la constante de Henry tient compte à la fois de la volatilité et de la solubilité du composé dans la phase liquide. Ainsi, en augmentant sa solubilité dans la phase liquide, le 2-nitrophénol est présent en quantités plus faibles dans la phase gazeuse.

Condition	0% EtOH	30% EtOH	50% EtOH
Temps de détection	25 minutes	27 minutes	75 minutes

**Salinité** Les milieux de culture contiennent souvent plusieurs espèces ioniques : non seulement du chlorure de sodium pour que la pression osmotique soit la même que le milieu intracellulaire (isotonique), mais aussi des tampons. Il arrive aussi que des milieux spécifiques contiennent de grandes quantités de sels (milieux hypertoniques) comme les géloses Chapman ( $[NaCl] = 75 \text{ mg/L}$ ) pour l'isolement des *Staphylococcus aureus* ou le Rappaport Vassiliadis, qui contient de grandes quantités de chlorure de magnésium pour l'isolement des *Salmonella*.

En chimie organique, lors d'une extraction liquide-liquide, du sel est souvent ajouté à la phase aqueuse pour diminuer la solubilité du composé afin qu'il passe dans la phase organique. Ainsi, on s'attend à ce qu'une forte salinité augmente la quantité de 2-nitrophénol dans la phase gazeuse. Cependant, ce n'est pas ce qui a été observé.

Condition	$[KCl] = 0 \text{ mol/L}$	$[KCl] = 1 \text{ mol/L}$	$[KCl] = 4 \text{ mol/L}$
Temps de détection	25 minutes	24 minutes	36 minutes

**Présence d'un tensioactif** La présence d'un tensioactif dans la phase aqueuse, doit *a priori* augmenter l'affinité du 2-nitrophénol pour celle-ci. En outre une molécule amphiphile, en couvrant

l'interface liquide-gaz, rend cette dernière moins accessible au 2-NP, ce qui doit ralentir le transfert de masse. Expérimentalement, cet effet est constaté seulement lorsque la concentration en tensioactif est supérieure à sa concentration micellaire critique, une partie du 2-nitrophénol est alors piégé au cœur des micelles. Ici, le tensioactif utilisé est le désoxycholate de sodium (cmc = 2 mmol/L).

Condition	[SDC] = 0 mol/L	[SDC] = 0,2 mmol/L	[SDC] = 5 mmol/L
Temps de détection	25 minutes	24 minutes	72 minutes

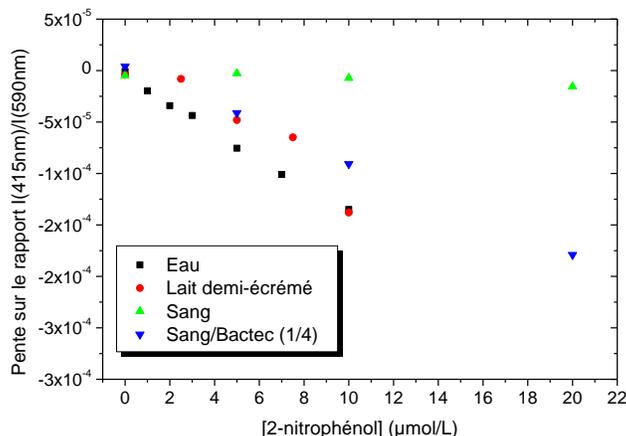
Cette étude nous a permis de mettre en évidence plusieurs facteurs physico-chimiques qui ont une influence sur la cinétique du partage du 2-nitrophénol entre phase aqueuse et gazeuse. En particulier, **le pH devra être fixé à une valeur inférieure au pK<sub>a</sub> du 2-nitrophénol** et une attention particulière devra être portée sur la présence d'espèces amphiphiles et de colloïdes lors des études dans des matrices complexes. En effet, ces derniers se lient au 2-NP et augmentent ainsi son affinité pour la phase aqueuse.

## 4.2 Détection du 2-nitrophénol issu de matrices complexes

Nous avons précédemment évalué la limite de détection du 2-nitrophénol dans l'eau tamponnée avec le montage de lecture en transmission à travers 5 xérogels (paragraphe 3.2). Les mêmes expériences sont réalisées dans deux milieux plus complexes dans lesquels le transfert de masse vers la phase gazeuse peut s'avérer plus difficile que dans l'eau pure :

- Du **lait demi-écrémé** : le lait est une émulsion directe où des gouttelettes de graisse sont en suspension dans l'eau ; la caséine, une protéine amphiphile du lait joue le rôle d'émulsifiant. Dans le lait, les molécules de 2-nitrophénol peuvent être emprisonnées dans les gouttelettes de graisse ou à l'interface graisse/eau. Pour s'affranchir du rôle joué par le pH, le lait a été tamponné à pH 6,1 avec du MES (0,15 mol/L).
- Du **sang de cheval défibriné** : le sang est un milieu très concentré en cellules, principalement des globules rouges avec une concentration de l'ordre de 4-6.10<sup>9</sup> cellules/mL. Ces cellules sont des colloïdes à la surface desquels peuvent s'adsorber les molécules de 2-nitrophénol.
- Du **sang de cheval défibriné dilué dans un milieu de culture commercial** pour hémoculture (BACTEC Peds Plus™/F, Becton Dickinson) dans un rapport volumique classique en hémoculture : 1/4. En plus des nutriments, les flacons d'hémocultures contiennent très souvent des substances qui permettent d'inhiber l'action antibactérienne du complément mais aussi l'action des antibiotiques.

Comme précédemment, cinq xérogels sont d'abord mis en présence de 50 mL d'eau tamponnée (MES, pH = 6,1) pendant une heure afin que la quantité de lumière transmise soit constante, puis différentes quantités de 2-nitrophénol sont ajoutées afin d'obtenir des concentrations variables. L'intensité à 415 nm diminue à cause de l'adsorption de 2-nitrophénol et pour chaque concentration, on relève la pente obtenue sur le rapport I(415 nm)/I(590 nm) (Figure 4.16).



**Figure 4.16 : Suivi de la capture de 2-nitrophénol issu de solutions complexes : lait demi-écrémé, sang et sang dilué par 5 dans un milieu pour hémoculture.**

Dans le sang de cheval, le transfert de masse du 2-nitrophénol vers la phase gazeuse est fortement diminué. Cela peut être dû à la fois à la concentration élevée en cellules et au pH de 7,4, proche du  $pK_a$  du 2-nitrophénol : à ce pH, la forme moléculaire volatile n'est pas majoritaire en solution.

En revanche, dans les conditions de l'hémoculture *i.e.* avec le sang dilué par 5 dans un milieu de culture, il est possible de détecter 5 µmol/L de 2-nitrophénol, de même que dans le lait demi-écrémé. En conclusion, même dans des milieux complexes, des faibles concentrations de 2-nitrophénol peuvent être mises en évidence à l'aide des xérogels.

## 5. Suivi de la production de 2-nitrophénol par hydrolyse de substrats enzymatiques dans des milieux simples

Après avoir mis au point des capteurs et étudié la détection du 2-NP généré chimiquement, nous nous sommes intéressés à sa production suite à l'hydrolyse d'un substrat enzymatique par des enzymes bactériennes. Cette étude sera suivie par l'utilisation des capteurs pour la détection en phase gazeuse de 2-NP produit biologiquement dans des milieux complexes.

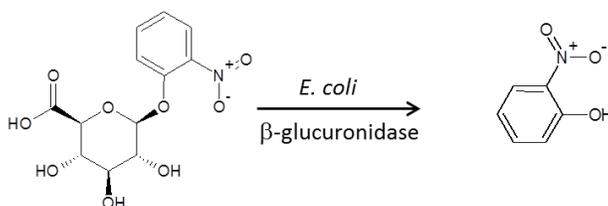
Nous nous intéressons à trois pathogènes d'intérêt en microbiologie clinique et industrielle qui sont *E. coli*, *Salmonella* et *S. aureus* et à leurs activités enzymatiques spécifiques :  $\beta$ -glucuronidase,  $C_8$ -estérase et  $\alpha$ -glucosidase respectivement.

La quantité d'enzymes synthétisées par un micro-organisme peut varier fortement en fonction de facteurs environnementaux tels que la température, le pH, la composition du milieu et la phase de croissance. [15] Les enzymes sont synthétisées par transcription de l'ADN en ARN messenger puis traduction de l'ARN messenger en une chaîne d'acides aminés. Les gènes impliqués dans un processus métabolique sont souvent groupés sur le chromosome et organisés en unité de transcription appelée opéron. Des protéines régulatrices contrôlent l'expression de ces gènes. En se liant à l'ADN au niveau de séquences spécifiques, elles régulent le taux de transcription. Certains mécanismes sont détaillés en Annexe 8. Ainsi, il est important d'avoir une idée de quels substrats, en se liant à ces protéines, vont

induire l'activité enzymatique (les inducteurs) alors que d'autres, comme le glucose, vont l'inhiber (répresseurs). Nous étudierons quels sont les composés qui, présents dans le milieu de culture, sont susceptibles d'induire l'activité enzymatique et lesquels vont l'inhiber, en particulier pour les activités  $\beta$ -glucuronidase et  $\alpha$ -glucosidase.

## 5.1 *E. coli* et l'enzyme $\beta$ -glucuronidase

La  $\beta$ -glucuronidase catalyse l'hydrolyse de sucres complexes contenant une unité  $\beta$ -D-glucuronoside. Cette enzyme spécifique est utilisée pour la mise en évidence d'*E. coli* dans des milieux de culture gélosés contenant des substrats chromogènes précipitants (gélouses TBX), ainsi que dans les cartes TEMPO EC (bioMérieux) pour la numération d'*E. coli* en matrice alimentaire à l'aide du substrat 4-méthylumbelliféryl- $\beta$ -D-glucuronide (MU- $\beta$ -GUR). Ce substrat, une fois hydrolysé, libère du 4-méthylumbelliférone fluorescent. [16][17]



**Figure 4.17 : Hydrolyse du substrat enzymatique 2-nitrophényl- $\beta$ -D-glucuronide par les enzymes  $\beta$ -glucuronidases d'*E. coli*.**

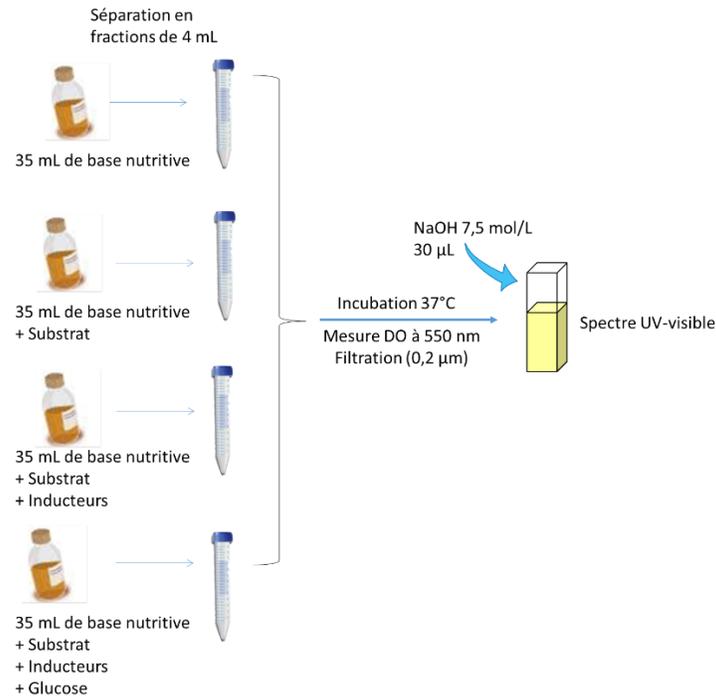
D'une part, nous avons cherché à savoir s'il est possible d'accélérer la synthèse de cette enzyme grâce à des inducteurs qui sont des substrats pour cette enzyme (à savoir le méthyl- $\beta$ -D-glucuronide et le glucuronate de sodium). D'autre part, nous nous sommes demandé si la présence de glucose provoque le même phénomène de répression catabolique pour le gène codant la  $\beta$ -glucuronidase que pour l'opéron lactose codant l'enzyme  $\beta$ -galactosidase (Annexe 8). [18]

Pour cela, nous avons suivi la production de 2-NP à partir de 2-nitrophénol- $\beta$ -D-glucuronide dans quatre conditions de culture pour deux espèces de bactéries, *Enterobacter cloacae* ATCC 13047 ( $\beta$ -glucuronidase négative) et *E. coli* ATCC 11775 ( $\beta$ -glucuronidase positive). Les compositions des milieux de culture sont détaillées en Annexe 7.4. Les quatre conditions de culture sont les suivantes :

- Base nutritive tamponnée à pH = 6,1 (MES) seule, sans substrats enzymatiques. Cette expérience permet de vérifier qu'aucun métabolite produit par *E. coli* autre que le 2-NP n'est absorbant à 415 nm.
- Base nutritive avec substrat enzymatique 2-nitrophényl- $\beta$ -D-glucuronide (113  $\mu$ mol/L)
- Base nutritive avec substrat enzymatique (113  $\mu$ mol/L) et inducteurs : méthyl  $\beta$ -D-glucuronide (240  $\mu$ mol/L) et glucuronate de sodium (461  $\mu$ mol/L).
- Base nutritive avec substrat, inducteurs dans les mêmes concentrations que ci-dessus et avec du D-(+)-glucose (1 g/L soit 5,5 mmol/L)

Pour les deux espèces *E. coli* et *E. cloacae*, quatre flacons contenant chacun 35 mL des quatre milieux différents sont inoculés avec une charge bactérienne initiale de 607 ufc/mL pour *E. coli* et de 743 ufc/mL pour *E. cloacae*. Ces flacons de 35 mL sont ensuite divisés en fractions de 4 mL qui sont incubées à 37°C pendant différentes durées afin de réaliser une pseudo-cinétique. Cette approche permet de s'affranchir du biais causé par la fraction de 2-nitrophénol perdu à chaque fois qu'un tube est ouvert pour prélever le milieu. En effet, en ouvrant le tube une partie de ce 2-NP contenu dans la phase gazeuse s'échappe, ce qui diminue la quantité de 2-nitrophénol en phase aqueuse d'après la loi de Henry. La pseudo-cinétique repose sur l'hypothèse qu'en partant de la même concentration bactérienne, la croissance sera la même pour toutes les fractions provenant d'un même flacon.

La Figure 4.18 décrit le protocole suivi : après plusieurs heures d'incubation à 37°C, les fractions sont collectées. Une mesure de densité optique à 550 nm permet d'estimer la population bactérienne. Les cultures sont ensuite filtrées à 0,2 µm et 30 µL de soude (C = 7,5 mol/L) sont ajoutés afin de déprotonner le tampon utilisé (MES) et de n'observer que la forme basique du 2-NP. Une mesure de l'absorbance à 415 nm permet d'évaluer la quantité de 2-NP produit.



**Figure 4.18 : Protocole pour le suivi de la production d'enzyme  $\beta$ -glucuronidase en présence d'inducteurs (méthyl  $\beta$ -D-glucuronide et glucuronate de sodium) et d'un répresseur (D-(+)-glucose).**

Premièrement, on observe bien une croissance des deux espèces dans les 4 types de milieu (Figure 4.19A et B). Sans surprise, quelles que soient les conditions de culture, on n'observe pas de 2-NP dans les milieux de culture inoculés avec *E. cloacae* qui est  $\beta$ -glucuronidase négative (Figure 4.19.D).

En l'absence de substrat enzymatique, le milieu inoculé avec *E. coli* ne présente pas de pic à 415 nm, il n'y a donc aucun métabolite susceptible d'interférer avec le 2-NP (Figure 4.19.C, courbe

noire). En présence de substrat enzymatique mais sans inducteur, la production d'enzymes pour hydrolyser le substrat intervient entre 9 h et 23 h (Figure 4.19.C, courbe rouge). **Lorsque des inducteurs sont ajoutés (méthyl  $\beta$ -D-glucuronide et glucuronate de sodium) l'hydrolyse du substrat intervient plus tôt (entre 7 h00 et 7h45 d'incubation) et la quantité de 2-nitrophénol produite après 23 h est plus importante (Figure 4.19.C, courbe bleue).**

Enfin, il est important de noter qu'en présence de glucose, l'hydrolyse du substrat n'intervient qu'entre 9 et 23 heures malgré la présence d'inducteurs (Figure 4.19.C, courbe verte). **Le glucose a un effet de répression catabolique qui réprime la transcription de l'ADN pour produire l'enzyme  $\beta$ -glucuronidase.** Cette information sera importante lorsqu'il s'agira de détecter cette activité enzymatique dans des matrices alimentaires où ce sucre peut être présent.

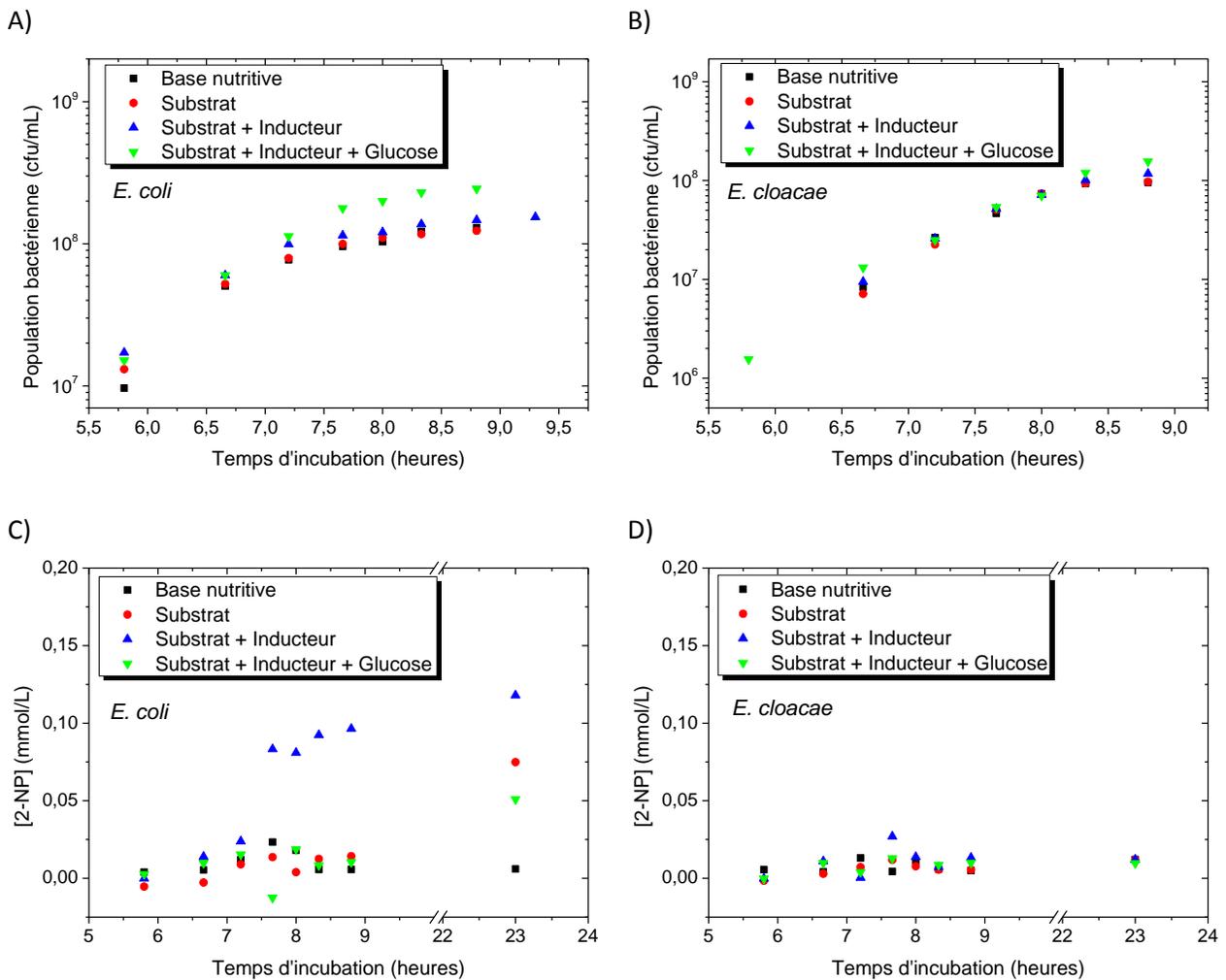
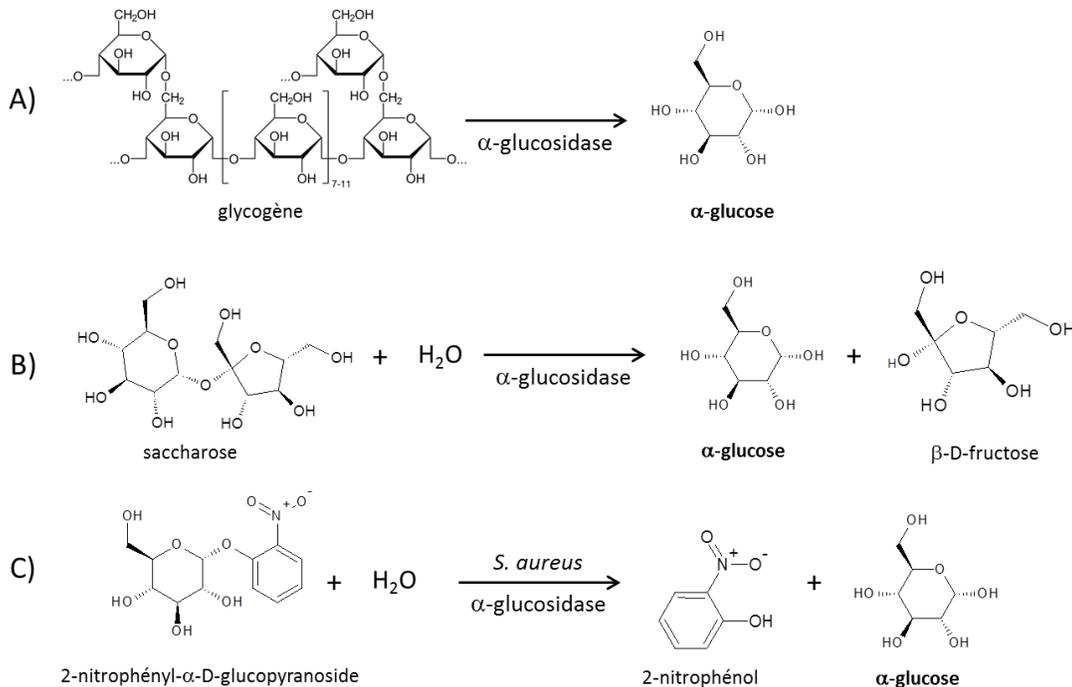


Figure 4.19 : A) et B) Suivi des populations bactériennes C) et D) Suivi de la concentration en 2-nitrophénol dans le milieu après incubation des cultures dans différentes conditions.

## 5.2 *S. aureus* et l'enzyme $\alpha$ -glucosidase

L'enzyme  $\alpha$ -glucosidase hydrolyse les liaisons osidiques  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 4 de nutriments comme l'amidon, le glycogène, le maltose ou le saccharose pour libérer de l' $\alpha$ -glucose (Figure 4.20).

Cette activité est utilisée dans des milieux gélosés afin de révéler la présence de *S. aureus*, où l'hydrolyse d'un substrat chromogène précipitant provoque la libération d'un composé coloré non soluble dans les cellules, et donc la coloration des colonies. [19][20]



**Figure 4.20 : Exemples d'hydrolyse de substrats par l'enzyme  $\alpha$ -glucosidase A) Hydrolyse du glycogène pour produire du glucose comme source d'énergie, B) hydrolyse du saccharose en deux oses : une molécule de glucose et une molécule de fructose, C) hydrolyse du substrat chromogène 2-nitrophényl- $\alpha$ -D-glucopyranoside par l' $\alpha$ -glucosidase de *S. aureus*.**

Dans un premier temps, des cultures ont été réalisées avec plusieurs espèces de staphylocoques afin d'estimer la spécificité de l'enzyme  $\alpha$ -glucosidase. Les cultures ont été réalisées dans un milieu riche non-spécifique dont la composition est détaillée en Annexe 7.6. Pour chaque souche/espèce, deux cultures sont réalisées :

- Dans la base nutritive avec le substrat 2-nitrophényl- $\alpha$ -D-glucopyranoside ( $\alpha$ -GLU-2-NP) à hauteur de 1 mmol/L
- Dans la base nutritive avec le substrat (1 mmol/L) et du méthyl  $\alpha$ -D-glucose (2,124 mmol/L). De manière similaire au méthyl- $\beta$ -D-glucuronide pour la  $\beta$ -glucuronidase, le méthyl  $\alpha$ -D-glucose pourrait être un inducteur de l'activité  $\alpha$ -glucosidase.

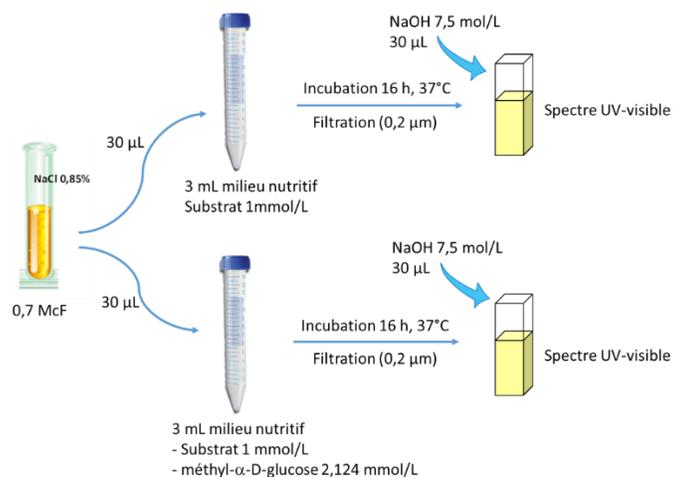
Les souches utilisées sont détaillées dans le Tableau 4.5 :

Espèce	Numéro ATCC	Référence interne
<i>S. aureus</i>	ATCC 6571	SA 49
<i>S. aureus</i>	ATCC BAA-1026	SA 56
<i>S. simulans</i>	ATCC 27851	SS 65
<i>S. haemolyticus</i>	ATCC 29970	SH 45
<i>S. epidermidis</i>	ATCC 14990	SE 9
<i>S. capitis</i>	ATCC 146	SC 89
<i>S. saprophyticus</i>	ATCC 15305	SS 91

**Tableau 4.5 : Souches de staphylocoques utilisées pour la mise en évidence de l'activité enzymatique  $\alpha$ -glucosidase.**

La Figure 4.21 décrit le protocole suivi : pour chaque espèce, une suspension à 0,7 McF dans du sérum physiologique est réalisée à partir d'une culture de travail sur milieu gélosé de moins de 24 h. 30  $\mu$ L de cette suspension à 0,7 McF sont dilués dans 3 mL de milieu de culture avec et sans méthyl- $\alpha$ -D-glucose.

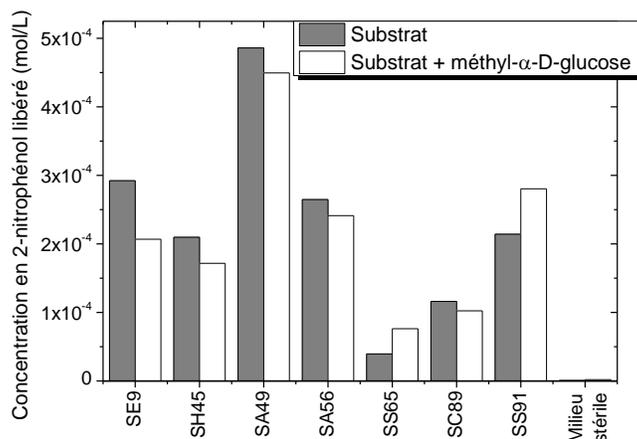
Ces 3 mL de milieu sont incubés à 37°C dans des tubes de 15 mL fermés hermétiquement. Ainsi, le 2-nitrophénol produit ne s'échappe pas du flacon pour ne pas appauvrir la phase liquide, cependant, le volume mort important (12 mL) permet de maintenir des conditions aérobies le plus longtemps possible. Après 16 h d'incubation, les cultures sont micro-filtrées (0,2  $\mu$ m) afin d'éliminer les bactéries, et 30  $\mu$ L de soude (C = 7,5 mol/L) sont ajoutés pour déprotonner le tampon utilisé (MES) et le 2-nitrophénol éventuellement libéré au cours de l'incubation. Un spectre UV-visible est acquis pour doser le 2-NP à 415 nm. Le même protocole est réalisé sur une culture stérile afin de vérifier que le substrat  $\alpha$ -GLU-2-NP ne s'hydrolyse pas à 37°C, ni en présence de soude.



**Figure 4.21 : Protocole pour la mise en évidence de l'activité  $\alpha$ -glucosidase chez plusieurs espèces de staphylocoques.**

La Figure 4.22 donne les concentrations en 2-nitrophénol dans les milieux de cultures après 16 h d'incubation. D'une part, lorsque la culture est stérile, il n'y a pas de 2-NP libéré, ce qui signifie que le substrat 2-nitrophényl- $\alpha$ -D-glucopyranoside ne s'hydrolyse pas à 37°C, ni à pH élevé après l'ajout de soude. D'autre part, pour toutes les espèces après 16 h de culture, il y a eu production de 2-nitrophénol.

Il n'y a que pour une souche de *S. aureus* que la production est significativement plus forte. Enfin, **la présence du méthyl  $\alpha$ -D-glucose a peu d'influence sur la quantité de 2-nitrophénol produit**. Il ne sera donc pas retenu comme inducteur de l'activité enzymatique. D'autres dérivés du glucose comme le maltose (un dimère d' $\alpha$ -glucose) ou le saccharose (un dimère  $\alpha$ -glucose + fructose) peuvent avoir un effet inducteur mais n'ont pas été testés. [21][22]



**Figure 4.22 : Concentrations en 2-nitrophénol mesurées dans les milieux de culture après 16 heures d'incubation**

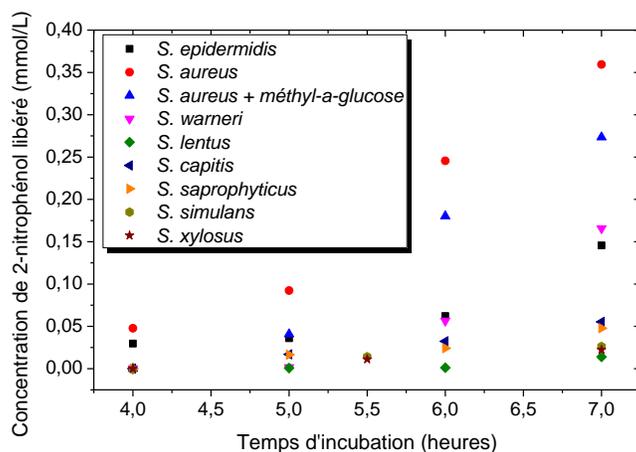
Par la suite, nous avons cherché à mettre en évidence les différences qui existent entre les espèces sur la cinétique d'hydrolyse du substrat. Pour cela, une étude cinétique a été réalisée en mesurant à différents temps d'incubation la population bactérienne et la quantité de 2-NP produit pour les espèces détaillées ci-dessous.

Espèce	Numéro ATCC	Référence interne
<i>S. aureus</i>	ATCC 6571	SA 49
<i>S. simulans</i>	ATCC 27851	SS 65
<i>S. saprophyticus</i>	ATCC 15305	SS 91
<i>S. capitis</i>	ATCC 146	SC 89
<i>S. lentus</i>	ATCC 700403	SL 64
<i>S. warneri</i>	ATCC 49454	SW 63
<i>S. xylosus</i>	ATCC 700404	SX 48
<i>S. epidermidis</i>	ATCC 14990	SE 9

**Tableau 4.6 : Souches de staphylocoques utilisées pour le suivi cinétique de l'hydrolyse du substrat 2-nitrophényl- $\alpha$ -glucopyranoside.**

Une suspension à 0,5 McF dans du sérum physiologique est réalisée à partir d'une culture de travail sur milieu gélosé de moins de 24 h. Pour les staphylocoques qui sont des bactéries plus petites que les *E coli*, une suspension à 0,5 McF correspond à environ  $1.10^8$  ufc/mL. 60  $\mu$ L de cette suspension sont dilués dans 6 mL de milieu de culture avec le substrat enzymatique (1 mmol/L). La charge bactérienne initiale est donc d'environ  $1.10^6$  ufc/mL. Le milieu de culture contient 1 mmol/L de substrat 2-nitrophényl- $\beta$ -D-glucopyranoside et ne contient pas de méthyl- $\alpha$ -D-glucose, seule la souche de *S. aureus* a été cultivée à la fois dans des milieux avec et sans méthyl- $\alpha$ -D-glucose (2,124 mmol/L).

Ces 6 mL de milieu sont incubés à 37°C dans des tubes de 15 mL fermés hermétiquement. A intervalles réguliers, environ 1,5 mL sont prélevés. La population bactérienne est mesurée soit par mesure de densité optique à 550 nm avec un spectromètre UV-visible (Cary 300) pour les souches de classe 1, soit par mesure au Densicheck (bioMérieux) qui donne une mesure de turbidité en McFarland, pour les souches de classe 2. Les prélèvements sont ensuite filtrés (0,2 µm), 30 µL de soude (C = 7,5 mol/L) sont ajoutés et un spectre UV-visible est acquis pour mesurer la quantité de 2-nitrophénol libéré (Figure 4.23). **C'est la souche de *Staphylococcus aureus* qui hydrolyse la plus grande quantité de substrat  $\alpha$ -GLU-2-NP.** Les souches de *S. warneri* et *S. epidermidis* hydrolysent aussi le substrat enzymatique.



**Figure 4.23 : Quantités de 2-nitrophénol libérées par hydrolyse du substrat 2-nitrophényl- $\alpha$ -glucopyranoside par différentes espèces de staphylocoques.**

Comme les souches utilisées ont des temps de génération différents, la population bactérienne n'est pas la même pour chacune des souches à un temps donné. Pour s'affranchir de ce paramètre, les concentrations en 2-NP ont été rapportées à la population bactérienne et au temps d'incubation afin d'obtenir un *turn-over*, c'est-à-dire un nombre de molécules de substrat hydrolysées par cellule et par unité de temps (Figure 4.24). Les souches *S. epidermidis* et *S. aureus* sont les seules pour lesquelles l'activité enzymatique démarre dès 4 h d'incubation. Pour *S. epidermidis*, elle diminue rapidement alors qu'elle reste élevée pour *S. aureus* tout au long de la culture.

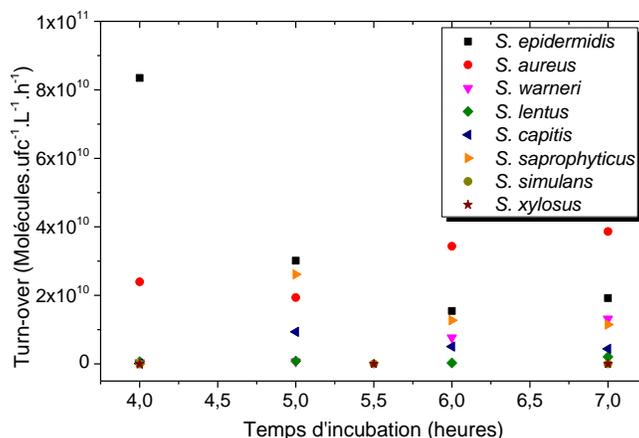


Figure 4.24 : Estimation pour chaque souche du nombre de molécules de substrat hydrolysées par cellule et par unité de temps.

### 5.3 *Salmonella* et l'enzyme C<sub>8</sub>-estérase

L'activité enzymatique C<sub>8</sub>-estérase est utilisée dans des milieux gélosés commerciaux comme BBL CHROMAgar (Becton Dickinson) afin de révéler la présence de *Salmonella*. Cette activité enzymatique est très peu présente chez les autres bactéries de la famille des *Enterobacteriaceae*. [16] La dissolution d'un substrat enzymatique contenant une chaîne alkyle avec 8 atomes de carbone est difficile dans un milieu de culture aqueux. L'utilisation de tensioactifs peut pallier ce problème. [23]

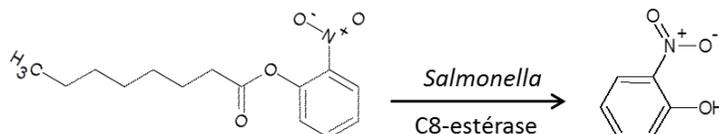


Figure 4.25 : Hydrolyse du substrat enzymatique 2-nitrophényl-caprylate par les enzymes estérases de *Salmonella*.

Dans un premier temps, nous avons cherché à dissoudre le substrat enzymatique 2-nitrophénylcaprylate (C<sub>8</sub>-2-NP) en milieu aqueux à l'aide de tensioactifs, et étudié l'impact de ces tensioactifs sur la volatilité du 2-NP. Puis, nous avons comparé l'activité enzymatique C<sub>8</sub>-estérase chez des bactéries de différentes familles. Un intérêt particulier a été porté chez les *Enterobacteriaceae*.

#### 5.3.1 Dissolution du substrat C<sub>8</sub>-2-NP

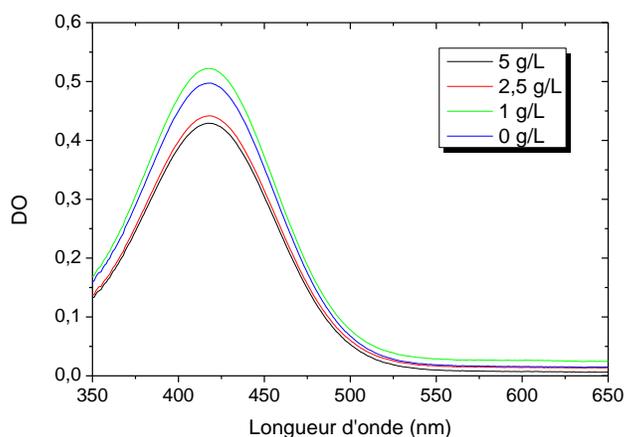
Pour dissoudre les substrats enzymatiques lipophiles pour la mise en évidence d'activités estérase, des tensioactifs comme le TWEEN 20 peuvent être ajoutés aux milieux de cultures. [23] Avec un HLB (*Hydrophilic/Lipophilic Balance*) de 16,7, le TWEEN 20 est soluble dans l'eau. Il forme des micelles à partir d'une concentration micellaire critique de  $8,04 \cdot 10^{-5}$  mol/L (soit 0,1 g/L). [24] Un brevet déposé par bioMérieux [23] recommande une concentration de TWEEN 20 de 25 g/L pour une concentration en substrat de 500 mg/L, soit un rapport  $\frac{[\text{TWEEN 20}]}{[\text{Substrat}]} = 50$  entre les concentrations massiques. Nous avons choisi une concentration en substrat de 100 mg/L (soit 380 µmol/L). Afin de le dissoudre dans de l'eau

tamponnée à pH 6,1 (MES, 0,15 mol/L), plusieurs concentrations de TWEEN 20 (Sigma, P9416) ont été testées (Tableau 4.7). En dessous de 1 g/L de TWEEN 20, le mélange est laiteux, le substrat est sous forme de particules en suspension. Au-delà de 1 g/L de TWEEN 20, les mélanges obtenus sont translucides : soit le substrat est complètement dissout, soit il est sous forme d'une suspension dont les particules ne diffusent pas la lumière visible. **Le rapport  $\frac{[TWEEN\ 20]}{[Substrat]}$  de 10 sera donc retenu car il permet d'obtenir une solution de substrat enzymatique translucide.**

Condition	brevet [23]	1	2	3	4
[Sustrat caprylate]	500 mg/L	100 mg/L	100 mg/L	100 mg/L	100 mg/L
[TWEEN 20]	25 g/L	5 g/L	2,5 g/L	1 g/L	0,15 g/L
$\frac{[TWEEN\ 20]}{[Substrat]}$	50	50	25	10	1,5
Aspect de la solution	translucide	translucide	translucide	translucide	laiteux

**Tableau 4.7 : Concentrations en substrat enzymatique (2-nitrophényl caprylate) et en surfactant (TWEEN 20) utilisées.**

Les concentrations élevées en TWEEN 20, ne semblent pas affecter la disponibilité et la dégradation du substrat par les bactéries. [23] Cependant, une fois le substrat hydrolysé, le passage du 2-nitrophénol généré en phase gazeuse peut être gêné par la présence de micelles et de molécules de TWEEN 20 à l'interface eau/air (c'était le cas en présence de désoxycholate de sodium, paragraphe 4.1). Afin de le vérifier simplement, des xérogels ont été placés au-dessus de solution aqueuses tamponnées à pH 6,1 (MES, 0,15 mol/L) contenant 1 mmol/L de 2-nitrophénol et différentes concentration en TWEEN 20 comprises entre 0 et 5 g/L. Des spectres UV-visible des xérogels ont été mesurés après une heure d'exposition (Figure 4.26). Pour des concentrations en TWEEN 20 jusqu'à 1 g/L, la quantité de 2-nitrophénol piégés n'est pas diminuée.



**Figure 4.26 : spectres d'absorption UV-visible de xérogels de composition TMOS/MeOH/ABTES/H<sub>2</sub>O = 1/10/0,15/4, séchés à 50°C, de 0,8 mm d'épaisseur, exposés 1 heure à des solutions contenant 1 mmol/L de 2-NP et différentes concentrations de TWEEN 20.**

### 5.3.2 Test enzymatique C<sub>8</sub>-estérase chez plusieurs bactéries

Dans un deuxième temps, nous avons comparé l'activité enzymatique C<sub>8</sub>-estérase chez des bactéries de différentes familles : des *Enterobacteriaceae* (Gram-), des *Staphylococcaceae* (Gram+), des *Xanthomonadaceae* (Gram-) et des *Saccharomycetaceae* (eucaryotes). Cette activité enzymatique est connue pour être très peu présente chez les bactéries de la famille des *Enterobacteriaceae* en dehors des *Salmonella*. [16]

Pour chaque souche, une suspension de bactéries à 0,5 McF dans du sérum physiologique est réalisée à partir d'une culture de travail de moins de 24h sur milieu gélosé. Cette suspension est estimée à environ 2.10<sup>8</sup> ufc/mL. L'expérience est réalisée sur des plaques 48 puits. Chaque puit contient 700 µL de milieu nutritif contenant 200 µmol/L (soit 53,1 mg/L) de substrat C<sub>8</sub>-2-NP et 531 mg/L de TWEEN 20 (rapport des concentrations massiques :  $\frac{[TWEEN\ 20]}{[Substrat]} = 10$ ). Les suspensions à 0,5 McF sont diluées au 1/10<sup>ème</sup> : 70 µL sont introduits dans 700 µL de milieu. Deux plaques à puits sont réalisées : une plaque est incubée 8 heures et l'autre 24 heures.

Un spectre UV-visible est acquis après incubation, filtration à 0,2µm et ajout de soude afin de déprotonner le 2-NP généré. La référence utilisée pour la mesure des spectres UV-visible est le milieu nutritif avec substrat enzymatique stérile. Un pic à 415 nm est signe de l'hydrolyse du substrat et de libération de 2-NP.

Le Tableau 4.8 résume les résultats obtenus après 8 h d'incubation. Parmi les *Enterobacteriaceae*, les deux souches de *Salmonella* ont bien hydrolysé le substrat. C'est le cas aussi pour *Enterobacter cloacae*. En revanche, les autres souches d'*Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli*, *Hafnia alvei* et *Citrobacter freundii*) n'ont pas hydrolysé le substrat. Enfin, les souches de la famille des *Staphylococcaceae* ont toutes généré du 2-NP.

Les résultats après 24 h ne seront pas pris en compte car les puits n'étant pas fermés de manière étanche, le 2-nitrophénol produit au cours de l'incubation se volatilise et se re-dissout partiellement dans les puits voisins. Ainsi, après 24 h d'incubation, tous les puits étaient positifs au 2-NP, même le puits témoin qui ne contenait que du milieu nutritif sans substrat C<sub>8</sub>-2-NP.

Espèce	Numéro collection	Référence interne	Famille	Résultats après 8h
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Enteritidis</i>	ATCC 13076	SE87	<i>Enterobacteriaceae</i>	+
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i>	ATCC 25241	SE98	<i>Enterobacteriaceae</i>	+
<i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC 13047	EC8	<i>Enterobacteriaceae</i>	+
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	EC10	<i>Enterobacteriaceae</i>	-
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 35421	EC21	<i>Enterobacteriaceae</i>	-
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 11775	EC28	<i>Enterobacteriaceae</i>	-
<i>Hafnia alvei</i>	ATCC 51815	HA54	<i>Enterobacteriaceae</i>	-
<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC 8090	CF7	<i>Enterobacteriaceae</i>	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 12228	SE26	<i>Staphylococcaceae</i>	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC BAA-2312	SA71	<i>Staphylococcaceae</i>	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	NCTC 12493	SA72	<i>Staphylococcaceae</i>	+
<i>Staphylococcus capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	ATCC 35661	SC90	<i>Staphylococcaceae</i>	+
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	ATCC 15305	SS91	<i>Staphylococcaceae</i>	+
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	ATCC 51331	SM53	<i>Xanthomonadaceae</i>	+
<i>Candida albicans</i>	ATCC 14053	CA36	<i>Saccharomycetaceae</i>	+
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ATCC 9763	SC42	<i>Saccharomycetaceae</i>	-

Tableau 4.8 : Résultats des tests enzymatiques C<sub>8</sub>-estérase pour les différentes souches étudiées.

## 6. Détection en phase gazeuse de 2-nitrophénol issu d'une hydrolyse enzymatique dans un milieu complexe

Deux milieux complexes sont envisagés :

- du sang de cheval défibriné pour tester nos capteurs dans les conditions d'une hémoculture en présence de *S. aureus* et *E. coli*.
- des matrices alimentaires parmi celles les plus souvent mises en cause dans des cas d'intoxications alimentaires à *Salmonella* : un produit laitier (camembert au lait cru) et un produit à base d'œuf (mayonnaise)

### 6.1 Infections du sang et hémoculture

Le sang est un milieu normalement stérile, et c'est la présence répétée de bactéries dans le système sanguin qui définit la bactériémie. *S. aureus* et *E. coli* réunis représentent 37,6% des bactériémies. Une septicémie est une infection généralisée grave de l'organisme due à des émissions massives et répétées de bactéries pathogènes dans le sang. Cet état est généralement associé à une réponse inflammatoire importante et à des complications pouvant entraîner le dysfonctionnement de plusieurs organes vitaux et parfois le décès du patient. Le taux de mortalité se situe autour de 20 %. [25]

Les concentrations en pathogène sont très faibles, le plus souvent inférieures à 10 ufc/mL, il est donc nécessaire de passer par une étape d'enrichissement de l'échantillon. [26] L'hémoculture consiste à mettre en culture un échantillon sanguin pour augmenter la charge bactérienne et ainsi augmenter la probabilité de détection. Il s'agit d'un simple test de détection ; si elle est positive, l'hémoculture est suivie de tests complémentaires pour déterminer l'identité du pathogène et sa susceptibilité aux antibiotiques. Pour les laboratoires de microbiologie, les hémocultures représentent un test très fréquent, de l'ordre du tiers de l'activité. [27]

<b>Micro-organismes</b>	<b>2007</b>
<b>Total Gram+</b>	<b>38,3%</b>
<i>Staphylococcus aureus</i>	16,1%
Staphylocoques à coagulase négative	10,1%
Entérocoques	7,2%
Autres	4,9%
<b>Total Gram-</b>	<b>50,9%</b>
<i>Escherichia coli</i>	21,5%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4,5%
<i>Enterobacter cloacae</i>	6,3%
Autres	10,6%
<b>Total autres</b>	<b>10,8%</b>

**Tableau 4.9 : Répartition des espèces de micro-organismes responsables de bactériémies nosocomiales. [28]**

Des automates d'hémoculture sont apparus dès les années 1970. Ils sont basés sur la détection des métabolites volatils, en particulier le CO<sub>2</sub> qui est le métabolite le plus générique. Plusieurs méthodes d'analyses ont été utilisées :

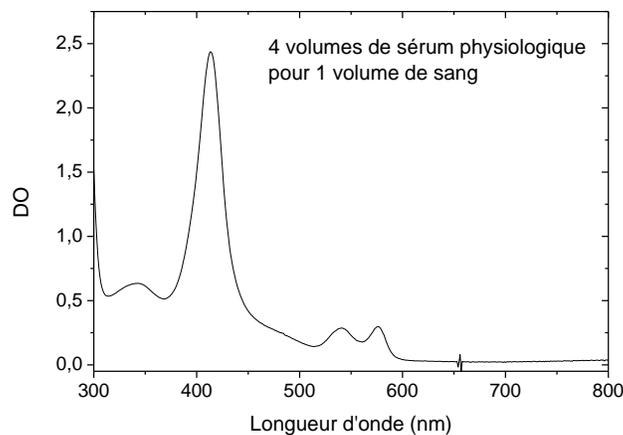
- Le marquage de substrats enzymatiques avec du <sup>14</sup>C de manière à permettre l'émission de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> détecté par comptage des particules β à 156 keV. (Bactec 460, Becton Dickinson)
- La détection manométrique de l'ensemble des métabolites gazeux générés, dont majoritairement le CO<sub>2</sub>. Chaque flacon est fermé hermétiquement et équipé d'un détecteur qui suit en continu la pression du gaz au-dessus du milieu de culture. (Versa TREK)
- La détection optique via une réaction acido-basique avec un indicateur de pH dans une matrice polymère. Lorsque le CO<sub>2</sub> diffuse du liquide vers le matériau hydraté, il forme de l'acide carbonique H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. La sonde de pH peut être chromophore (BacT/Alert, bioMérieux et Biolumix) ou fluorophore (Bactec 9240, Becton Dickinson).
- La spectroscopie d'absorbance infra-rouge (BioArgos, Bio-Rad et Bactec 660, Becton Dickinson).

On se propose ici de remplacer le CO<sub>2</sub> par un métabolite exogène, par exemple le 2-nitrophénol. Contrairement au CO<sub>2</sub> déjà présent dans l'atmosphère (~400 ppm) ou dans le sang du patient, un COV exogène comme le 2-NP n'est pas naturellement présent dans l'espace de tête au-dessus d'une culture. Cela évite donc d'avoir un *offset*. En outre, les molécules utilisées pour révéler la présence de CO<sub>2</sub> sont des sondes de pH. Ces sondes ne sont donc pas spécifiques. Il faut ajouter à cela qu'au pH du sang, c'est une forme anionique non volatile qui prédomine, l'hydrogénocarbonate, qui est aussi particulièrement hydrophile.

Au contraire, un COV exogène sera détecté par une réaction sonde-cible spécifique (comme DMACA et β-NA) ou grâce à ses propriétés optiques intrinsèques, absorbance à une longueur d'onde particulière pour le 2-NP ou émission de fluorescence pour la β-NA.

Pour détecter spécifiquement certains groupes de bactéries, il est possible de cibler des activités enzymatiques spécifiques. Au contraire, dans le cas de l'hémoculture, il faut choisir une activité ou une combinaison de plusieurs activités enzymatiques afin de couvrir une gamme de pathogènes la plus large possible : Gram+, des Gram-, champignons, etc. [29]

Le sang est un milieu complexe composé à 55% de plasma et 45% de cellules parmi lesquelles des globules rouges (4-5.10<sup>9</sup> /mL), des globules blancs (5-7.10<sup>6</sup> /mL) et des plaquettes (1-4.10<sup>8</sup> /mL). Cette forte concentration en cellules rend le sang diffusant et la présence d'hémoglobine est responsable de la forte coloration rouge (Figure 4.27). Du fait de ces propriétés optiques défavorables, une révélation de l'hydrolyse enzymatique en phase liquide est impossible. Dans un tel milieu, plusieurs étapes pourront être ralenties, à savoir la croissance bactérienne, l'accès au substrat enzymatique, son hydrolyse, et le transfert de masse du métabolite vers la phase gazeuse. Nous avons déjà montré au paragraphe 4.2 que ce dernier est peu influencé lorsque le sang est dilué par 5 dans un milieu de culture.



**Figure 4.27 : Spectre UV-visible d'une solution de sang de cheval dilué par 5 dans du sérum physiologique. Chemin optique : 1 cm.**

## 6.2 Détection de pathogènes dans du sang de cheval défibriné

Nous nous sommes intéressés à la mise en évidence de deux pathogènes courants dans les infections du sang : *E. coli* et *S. aureus*. Ces pathogènes sont responsables de 21,5% et 16,1% des bactériémies respectivement. [28]

Les mélanges sang/milieu nutritif sont très absorbants et diffusants, il est donc impossible de mesurer en continu la population bactérienne par une simple mesure de densité optique, ni de suivre la concentration en 2-nitrophénol dans la phase liquide. Des boîtes de comptages sont réalisées pour suivre la population bactérienne et la libération de 2-nitrophénol est suivie en phase gazeuse par adsorption dans un xérogel.

Les expériences réalisées sont des pseudo-cinétiques dans lesquelles des xérogels ont été placés au-dessus d'hémocultures. Le ratio volumique sang/milieu nutritif est fixé à 1/4, ce qui est une dilution classique en hémoculture. [26] Pour réaliser une pseudo-cinétique, plusieurs flacons en verre de 100mL contenant 10 mL de sang et 40 mL de milieu nutritif sont inoculés avec la même charge bactérienne et incubés dans les mêmes conditions. A chaque point de mesure, une hémoculture est interrompue pour mesurer le spectre UV-visible d'un xérogel placé au-dessus de la culture. Cette précaution permet d'éviter un biais dû à la perte d'une fraction du 2-nitrophénol à chaque fois que le flacon est ouvert pour récupérer le xérogel. Le sang utilisé est du sang de cheval auquel a été retirée la fibrine (bioMérieux REF 55832), une protéine responsable de la coagulation du sang. Les xérogels sont maintenus sur un support en aluminium qui est inséré dans le goulot du flacon (Figure 4.28). Les xérogels utilisés contiennent les ratios molaires suivants : TMOS/MeOH/ABTES/H<sub>2</sub>O = 1/10/0,15/1, ont séché à 50°C et ont une épaisseur de 0,8 mm.



Figure 4.28 : Photographies d'un flacon contenant le sang de cheval dilué dans un milieu de culture (à gauche) et d'un xérogel dans un support en aluminium qui est inséré dans le goulot du flacon (à droite).

### 6.2.1 Détection d'*E. coli* dans du sang de cheval

Dans un premier temps, des pseudo-cinétiques ont été réalisées dans quatre conditions :

- Avec *Escherichia coli* (ATCC11775,  $\beta$ -glucuronidase positive), pour une charge bactérienne initiale de 100 ufc/mL, dans le mélange sang/milieu nutritif avec le substrat 2-nitrophényl- $\beta$ -D-glucuronide et les inducteurs (méthyl- $\beta$ -D-glucuronide, et glucuronate de sodium)

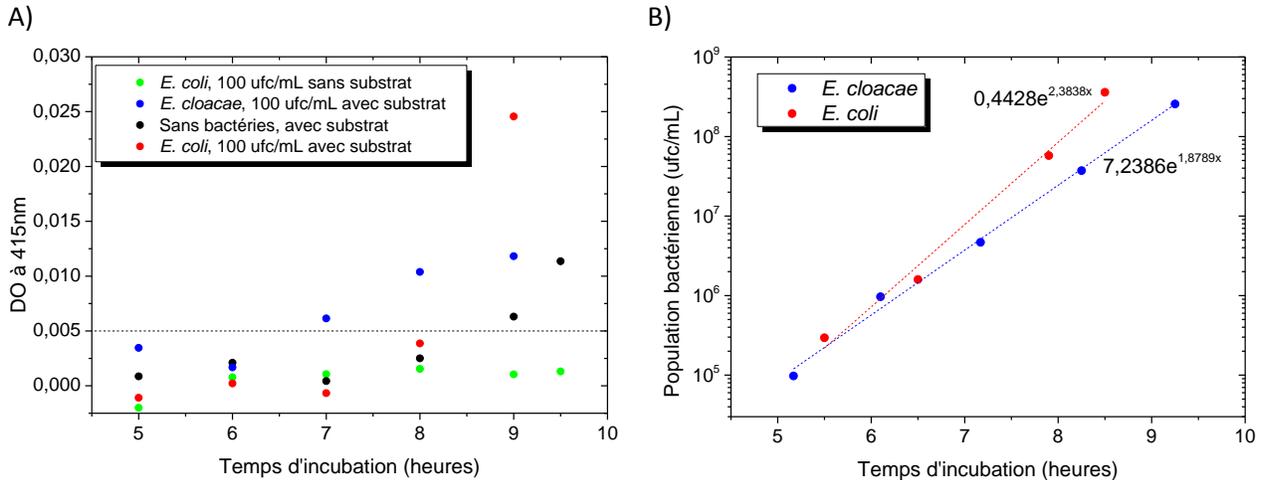
- *Enterobacter cloacae* (ATCC13047,  $\beta$ -glucuronidase négative), pour une charge bactérienne initiale de 100 ufc/mL, dans le mélange sang/milieu nutritif avec le substrat enzymatique et les inducteurs
- Avec *Escherichia coli* ( $\beta$ -glucuronidase positive), pour une charge bactérienne initiale de 100 ufc/mL, dans le mélange sang/milieu nutritif sans le substrat.
- Sans bactéries dans le mélange sang/milieu nutritif, avec le substrat et les inducteurs

Le substrat  $\beta$ -glucuronidase, lorsqu'il est présent, est employé à la concentration de 111  $\mu\text{mol/L}$  et les inducteurs aux concentrations de 239  $\mu\text{mol/L}$  pour le méthyl- $\beta$ -D-glucuronide et 464  $\mu\text{mol/L}$  pour le glucuronate de sodium. Un xérogel est placé dans le goulot de chaque flacon, puis ils sont incubés à 37°C avec agitation (140 rpm). A intervalles réguliers, un spectre UV-visible des xérogels est mesuré et des boîtes de comptages sont réalisées afin d'estimer la population bactérienne.

Le suivi de la population bactérienne permet de calculer le temps de génération des bactéries, c'est-à-dire le temps nécessaire pour que la population soit doublée (Figure 4.29.B). Il est de 22 min pour *E. cloacae* et 18 min pour *E. coli*. Ces valeurs sont comparables à celles obtenues dans un milieu de culture simple, [30] cela permet d'affirmer que croissance des bactéries n'est pas gênée par la présence du sang.

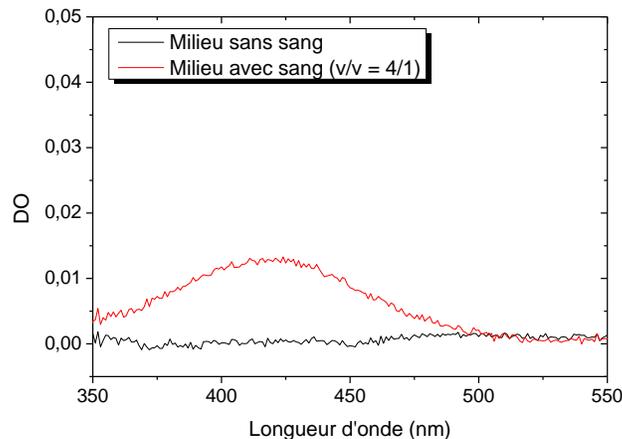
Lorsqu'il n'y a pas de substrat enzymatique dans le milieu, on n'observe pas de pic d'absorbance dans les spectres UV-visible des xérogels (points verts sur la Figure 4.29.A). On en déduit qu'il n'y a pas d'autres métabolites volatils absorbants qui pourraient interférer avec le 2-nitrophénol à 415 nm. De manière surprenante, les xérogels placés au-dessus des deux cultures témoins (*i.e.* mélange sang/milieu nutritif non ensemencée et hémoculture ensemencée avec l'espèce  $\beta$ -glucuronidase négative) sont devenus jaunes avec le pic caractéristique du 2-nitrophénol à 415 nm. Plusieurs hypothèses sont avancées pour l'expliquer :

- (1) le substrat enzymatique s'hydrolyse à 37°C, ce qui libère du 2-nitrophénol sans la présence d'enzymes,
- (2) le sang de cheval contient des enzymes  $\beta$ -glucuronidases



**Figure 4.29 : A) Absorbance des xérogels (chemin optique 0,8 mm) à 415 nm après incubation au-dessus d'hémocultures. B) Suivi de la population bactérienne pour *E. coli* et *E. cloacae* dans le mélange milieu nutritif et sang de cheval.**

La première hypothèse est écartée grâce aux observations effectuées en Figure 4.19 : en présence d'*E. cloacae*, à 37°C, il n'y avait pas de 2-nitrophénol libéré dans le milieu. Une deuxième expérience a permis de confirmer ce résultat : des xérogels ont été placés au-dessus du milieu contenant le substrat (1 mmol/L) avec ou sans sang pendant 7 heures à 37°C. Seul le xérogel placé au-dessus du mélange avec le sang est devenu jaune (Figure 4.30), l'autre est resté incolore, ce qui confirme que l'hydrolyse du substrat n'est pas dû à la température de 37°C, mais à la présence d'enzymes dans le sang de cheval.

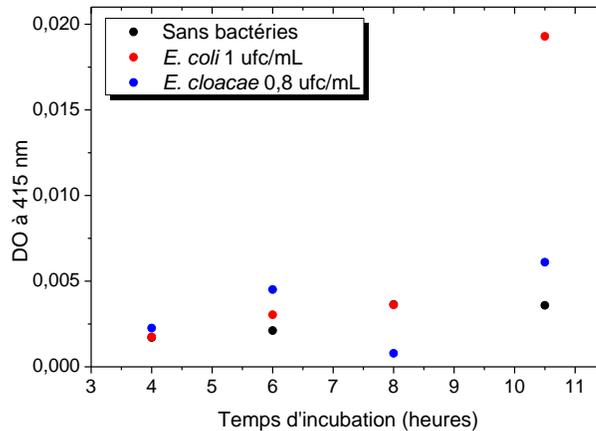


**Figure 4.30 : Spectres UV-visible de xérogels TMOS/MeOH/ABTES/H<sub>2</sub>O = 1/10/0,15/1 qui ont séché à 50°C et de 0,8 mm d'épaisseur exposés 7 heures à 37°C au-dessus de milieu nutritif avec substrat (40 mL) ou au-dessus de milieu nutritif avec substrat (40 mL) et sang de cheval (10 mL).**

Ainsi, le 2-nitrophénol généré par les enzymes du sang constitue un signal de fond duquel l'activité enzymatique bactérienne doit se démarquer pour permettre une détection des hémocultures positives. Sur la Figure 4.29.A, on observe que l'activité glucuronidase des bactéries se distingue de ce

fond enzymatique après 9 h d'incubation, lorsque la population bactérienne est suffisamment importante (environ  $5.10^8$  ufc/mL).

La même expérience a été réalisée avec cette fois une charge bactérienne initiale d'environ 1 ufc/mL. Les flacons de pseudo-cinétique sont inoculés avec 50  $\mu$ L d'une suspension diluée jusque  $10^3$  ufc/mL. Après 10 h d'incubation, l'activité enzymatique des bactéries *E. coli* est suffisamment importante pour être mise en évidence grâce à l'absorbance à 415 nm du 2-nitrophénolate piégé dans le xérogel (Figure 4.31).

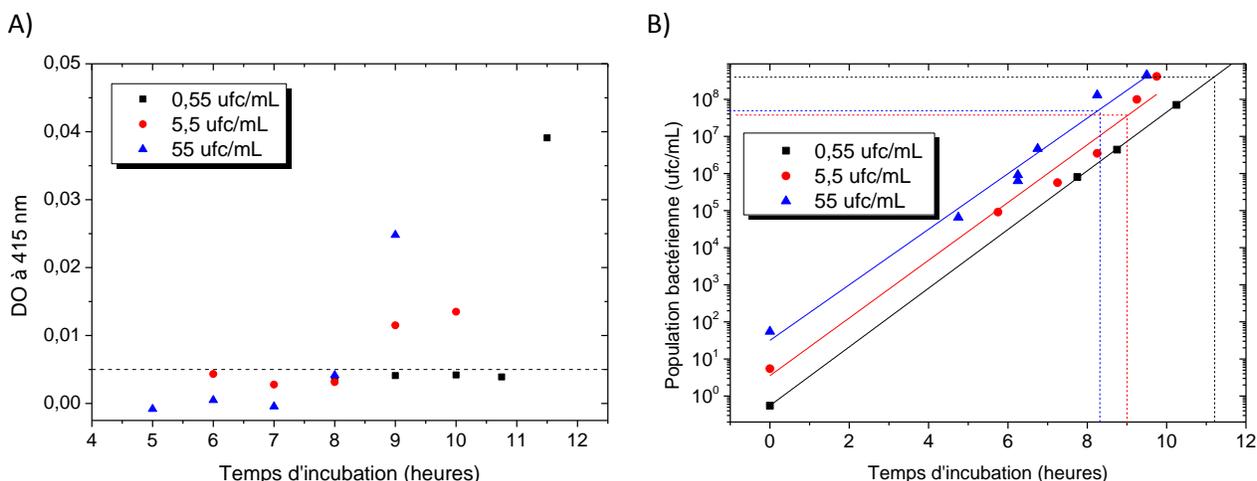


**Figure 4.31 : Absorbance des xérogels (chemin optique 0,8 mm) à 415 nm après incubation au-dessus de cultures dans un mélange milieu nutritif/sang de cheval. Les concentrations indiquées correspondent aux charges bactériennes de départ.**

Enfin, une pseudo-cinétique a été réalisée sur des hémocultures avec trois charges bactériennes différentes dans le mélange milieu nutritif/sang : 0,55 ufc/mL, 5,5 ufc/mL et 55 ufc/mL. L'absorbance des xérogels à 415 nm est suivie au cours du temps (Figure 4.32.A) ainsi que la population bactérienne à l'aide de comptages sur boîtes (Figure 4.32.B).

Pour les trois charges bactériennes initiales, les temps de génération mesurés sont compris entre 23 et 24 minutes. Pour les charges bactériennes initiales de 55 et 5,5 ufc/mL, à  $t = 9$  h, l'absorbance à 415 nm devient bien supérieure à la limite de détection du spectrophotomètre (0,005 : trait en pointillé sur la Figure 4.32.A). Elle se distingue de l'absorbance due à l'activité enzymatique du sang (qui peut être assimilée à la courbe noire à  $t = 9$  h). Il s'agit donc du temps à partir duquel l'activité enzymatique des bactéries se distingue de celle du sang. L'accroissement d'absorbance dû à l'activité enzymatique bactérienne est soudain ; il se distingue ainsi de l'activité enzymatique intrinsèque du sang.

En reportant ces temps de détection de l'activité enzymatique sur la courbe donnant les populations bactériennes (lignes en pointillé, Figure 4.32.B), nous constatons que la détection de l'activité enzymatique des bactéries n'intervient que lorsque la population bactérienne atteint au moins  $4.10^7$  ufc/mL.



**Figure 4.32 : A) Absorbances à 415 nm des xérogels placés au-dessus des différentes cultures (chemin optique : 0,8 mm). La ligne pointillée symbolise la limite de détection du spectrophotomètre, les concentrations indiquées correspondent aux charges bactériennes de départ. B) Suivi des populations bactériennes pour les différentes charges bactériennes de départ.**

Le Tableau 4.10 résume les temps de détection observés pour les différentes charges bactériennes en *E. coli* dans les hémocultures réalisées et propose une comparaison avec les automates d'hémoculture basés sur la détection optique du CO<sub>2</sub>. On en conclut que notre système basé sur la détection du 2-NP n'est pas encore significativement plus performant que les automates actuels. Il faut notamment incriminer l'activité enzymatique intrinsèque du sang pour expliquer ces performances décevantes.

Système de détection	Charge bactérienne initiale	temps de détection (heures)	Référence
VOC exogène	100 ufc/mL	9	Figure 4.29
VOC exogène	55 ufc/mL	9	Figure 4.32
VOC exogène	5,5 ufc/mL	9	Figure 4.32
VOC exogène	1 ufc/mL	10	Figure 4.31
BacT/Alert (BioMérieux) (Détection colorimétrique du CO <sub>2</sub> )	300-3000 ufc/mL	9,5	[31]
Bactec 460 (Becton Dickinson) (Détection du CO <sub>2</sub> en fluorescence)	300-3000 ufc/mL	10	[31]

**Tableau 4.10 : Temps de détection observés pour les différentes charges bactériennes initiales en *E. coli* dans les hémocultures**

### 6.2.2 Détection de *S. aureus* dans du sang de cheval

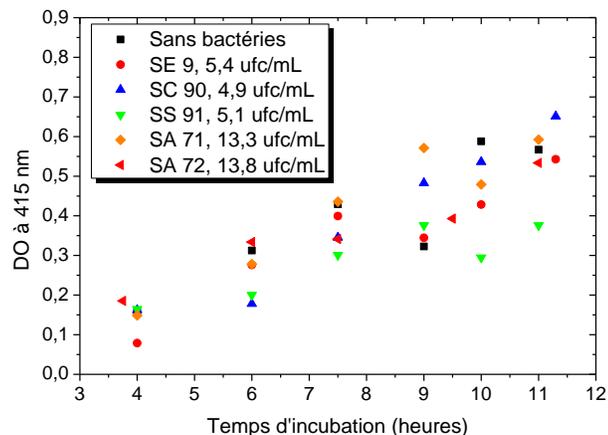
Pour la détection de *S. aureus* en hémoculture, nous avons choisi de cibler son activité  $\alpha$ -glucosidase. Des pseudo-cinétiques ont été réalisées dans les mêmes conditions que précédemment. Des xérogels sont placés au-dessus de mélanges milieu nutritif/sang de cheval (v/v = 4/1) présentant une charge initiale d'environ 10 ufc/mL. Les souches utilisées sont détaillées dans le Tableau 4.11. La concentration en substrat enzymatique 2-nitrophényl- $\alpha$ -glucopyranoside ( $\alpha$ -GLU-2-NP) est fixée à 100  $\mu$ mol/L. Les flacons sont incubés à 37°C (agitation 130 rpm) pendant différentes durées.

Espèce	Numéro ATCC	Référence interne
<i>S. aureus</i>	ATCC BAA-2312	SA 71
<i>S. aureus</i>	NCTC 12493	SA 72
<i>S. epidermidis</i>	ATCC 14990	SE9
<i>S. capitis</i>	ATCC 146	SC89
<i>S. capitis subsp capitis</i>	ATCC 35661	SC90
<i>S. saprophyticus</i>	ATCC 15305	SS91

**Tableau 4.11 : Espèces de staphylocoques utilisées pour la mise en évidence dans un mélange milieu de culture/sang de cheval *via* le 2-nitrophénol généré en phase gazeuse.**

Comme c'était le cas pour l'enzyme  $\beta$ -glucuronidase, le sang de cheval a une activité enzymatique  $\alpha$ -glucosidase intrinsèque (Figure 4.33, courbe noire). Cette dernière est d'ailleurs encore plus importante que l'activité  $\beta$ -glucuronidase. A concentrations en substrat enzymatique proches (respectivement 111  $\mu\text{mol/L}$  et 100  $\mu\text{mol/L}$  pour les substrats  $\beta$ -glucuronidase et  $\alpha$ -glucosidase), et après 9 h de culture, on peut observer que l'absorbance des xérogels à 415 nm est de 0,01 après hydrolyse du substrat  $\beta$ -GUR-2-NP, alors qu'elle dépasse 0,4 après hydrolyse du substrat  $\alpha$ -GLU-2-NP. On aurait pu s'attendre à ce qu'après un certain temps d'incubation, l'activité des enzymes du sang diminue, or, ce n'est pas ce qui est observé. Ce phénomène pose deux problèmes :

- Pour une charge bactérienne initiale de 13 ufc/mL, l'activité enzymatique des bactéries n'est pas suffisante pour dépasser celle du sang (Figure 4.33).
- Au bout d'un certain temps, même si le nombre de bactéries est suffisant pour que leur activité soit détectable, il est possible que l'intégralité du substrat 2-nitrophényl- $\alpha$ -glucopyranoside ait déjà été hydrolysée par les enzymes du sang.



**Figure 4.33 : Absorbance des xérogels (chemin optique 0,8 mm) à 415 nm après incubation au-dessus d'hémocultures de staphylocoques. Les concentrations indiquées correspondent aux charges bactériennes initiales.**

Un calcul rapide permet d'estimer quelle quantité de 2-nitrophénol a été piégée dans un xérogel placé au-dessus d'un témoin sans bactéries après 11h30 d'incubation :

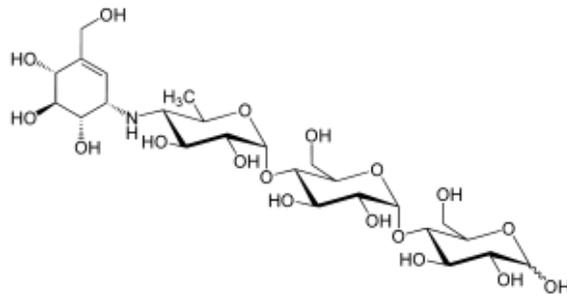
L'absorbance atteint 0,6 dans les xérogels après 11 h30 d'incubation, soit une concentration en 2-NP<sup>-</sup> de  $C = 2 \text{ mmol/L}$  dans le xérogel (avec  $L = 0,8 \text{ mm}$  et  $\varepsilon = 3500 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ). Les dimensions d'un xérogel sont les suivantes :  $0,8 \times 5 \times 8 \text{ mm}$  ; le volume du xérogel est donc :  $V_{\text{xérogel}} = 32 \text{ mm}^3 = 32.10^{-6} \text{ L}$ . La quantité de 2-NP<sup>-</sup> piégé est donc  $n_{\text{xérogel}} = 6,4.10^{-8} \text{ mol}$ . Initialement, on a introduit 40 mL de milieu à  $100 \mu\text{mol/L}$  en substrat enzymatique soit  $n = 4.10^{-6} \text{ mol}$ .

La quantité de 2-nitrophénol dans le xérogel correspond à 1,6% de la quantité de substrat introduite dans le milieu de culture. Cependant, il n'est pas possible d'en déduire la concentration en 2-NP en phase aqueuse et donc la fraction de substrat enzymatique hydrolysée par le sang. En effet la loi de Henry ne s'applique pas ici à cause de la présence d'une troisième phase, le xérogel, qui appauvrit la phase gazeuse et déplace l'équilibre.

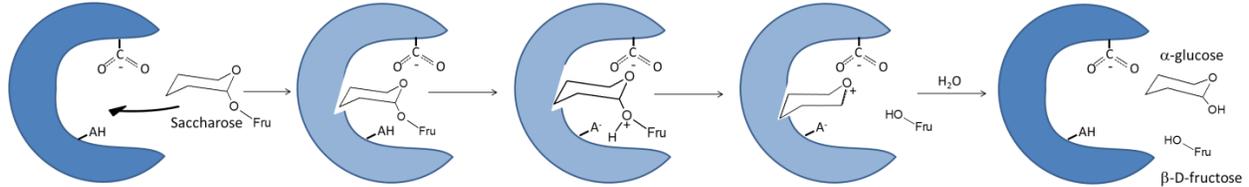
**Un inhibiteur d' $\alpha$ -glucosidase : l'acarbose** Une solution qui peut être envisagée pour limiter l'activité enzymatique du sang est l'utilisation d'un inhibiteur d' $\alpha$ -glucosidase. L'acarbose, par exemple, est un médicament utilisé pour traiter le diabète de type 2. En diminuant l'activité des  $\alpha$ -glucosidases, les polysaccharides sont dégradés moins rapidement en monosaccharide (comme le glucose), ce qui tend à limiter le niveau de glucose dans le sang. Avec ses trois unités  $\alpha$ -glucose, l'acarbose présente une structure similaire aux substrats de l' $\alpha$ -glucosidase (Figure 4.34.A). Son affinité pour l'enzyme est très forte, il joue donc un rôle d'inhibiteur compétitif. En raison de sa structure il va rester chimiquement inerte et ne sera pas hydrolysé. [32][33]

L'objectif est d'utiliser l'acarbose pour inhiber tout ou partie des enzymes présentes dans le sang afin de réduire fortement l'activité enzymatique intrinsèque de l'échantillon. Ce rôle d'inhibiteur a été testé à la fois sur le sang de cheval et sur du plasma de cheval. Le plasma est la fraction liquide du sang dans laquelle les cellules sont en suspension. On y trouve en particulier des ions qui assurent une régulation de la pression osmotique et du pH, des nutriments (acides aminés, lipides...) et des déchets métaboliques en transit (urée, bilirubine,  $\text{CO}_2$ ...), ainsi que des protéines (albumine, anticorps...). On retrouve en particulier un liquide dérivé du plasma, l'exsudat, dans les plaies aiguës ou chroniques. Si des germes sont présents de façon constante dans des plaies chroniques, il est important de surveiller la survenue de micro-organismes qui pourraient provoquer une infection de la plaie.

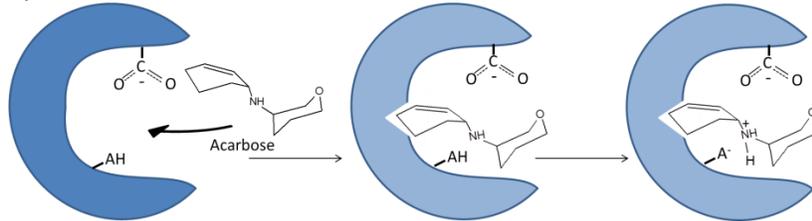
A)



B)



C)



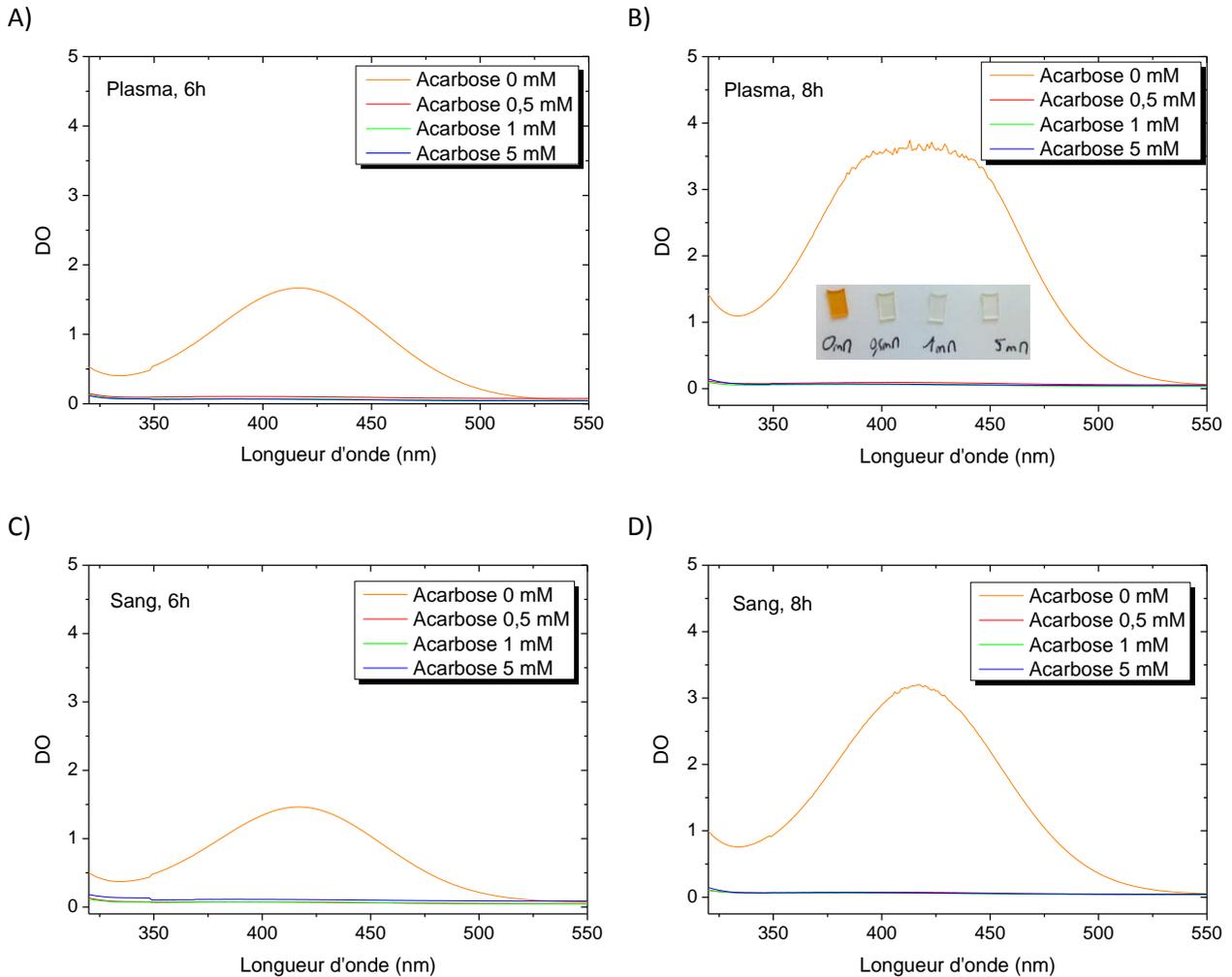
**Figure 4.34 : A) Structure de l'acarbose. B) Représentation schématique de l'hydrolyse du saccharose par une  $\alpha$ -glucosidase pour libérer une molécule d' $\alpha$ -glucose et une molécule de fructose. Le cycle intermédiaire chargé positivement est stabilisé par la présence du carboxylate. C) Représentation schématique du blocage de cette enzyme par liaison avec l'acarbose. [33]**

Trois concentrations différentes d'acarbose (0,5, 1 et 5 mmol/L ; A8980 Sigma) ont été introduites dans le milieu nutritif contenant 1 mmol/L de substrat  $\alpha$ -GLU-2-NP. A 40 mL de ce milieu sont ajoutés 10 mL de sang défibriné de cheval ou 10 mL de plasma de cheval. Après 6 h et 8 h d'incubation à 37°C, les xérogels sont prélevés et leur spectre UV-visible est acquis (Figure 4.35). Deux conclusions peuvent être tirées de cette expérience :

- Les enzymes  $\alpha$ -glucosidases du sang se retrouvent dans le plasma. On s'attend donc aussi à les trouver dans l'exsudat des plaies.
- L'acarbose joue bien son rôle d'inhibiteur puisque dès 0,5 mol/L dans le milieu, on ne retrouve pas de trace de 2-nitrophénol en phase gazeuse.

L'utilisation d'acarbose est donc une solution envisageable pour la mise en évidence de l'activité  $\alpha$ -glucosidase de *S. aureus* dans les échantillons sanguins et les plaies, en inhibant les enzymes déjà présentes intrinsèquement dans le sang et l'exsudat. Des études complémentaires devront être menées afin de déterminer la concentration optimale d'acarbose à introduire afin d'inhiber les enzymes de la matrice sans inactiver celle des *S. aureus*. Il est malheureusement fort probable que la concentration en  $\alpha$ -glucosidase dans le sang des patients soit très variable, ce qui nous obligera à ajouter

l'acarbose en défaut, nous empêchant ainsi d'éliminer entièrement l'activité enzymatique intrinsèque des échantillons.



**Figure 4.35 : A° et B) Spectres UV-visible de xérogels placés au-dessus d'un mélange plasma/milieu nutritif (1/4) avec différentes concentrations en acarbose. B) et C) Spectres UV-visible de xérogels placés au-dessus d'un mélange sang/milieu nutritif (1/4) avec différentes concentrations en acarbose, chemin optique : 0,8 mm.**

Les études menées dans le sang de cheval ont permis de mettre en évidence une difficulté inhérente à ce milieu : la présence intrinsèque d'enzymes. Le niveau de fond mesuré en l'absence de bactéries dépend de l'activité enzymatique choisie. Elle reste relativement faible pour l'activité  $\beta$ -glucuronidase, ce qui permet de détecter spécifiquement l'activité  $\beta$ -glucuronidase de *E.coli* avec une charge bactérienne initiale aussi faible que 0,5 ufc/ml. En revanche, l'activité intrinsèque  $\alpha$ -glucosidase est beaucoup plus importante, cette activité n'a donc pas pu être mise à profit pour la détection spécifique de *S. aureus*. L'utilisation d'un inhibiteur, l'acarbose, est une piste à envisager afin de diminuer ce niveau de fond. Nous nous sommes intéressés par la suite à une autre application : la détection de pathogène dans les denrées alimentaires.

### 6.3 Détection de pathogènes dans des échantillons alimentaires

Après l'application hémoculture, nous nous sommes intéressés à un autre type de matrice complexe d'intérêt: les matrices alimentaires. Deux pathogènes ont été envisagés : *S. aureus* et *Salmonella*.

#### 6.3.1 Détection de *Salmonella*

La méthode normalisée ISO 6579 de 2002, décrite dans le chapitre 2, se divise en 4 étapes détaillées dans la Figure 4.36 :

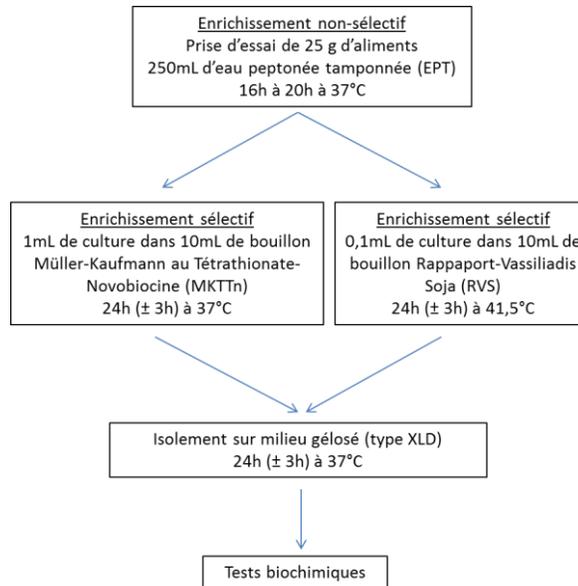


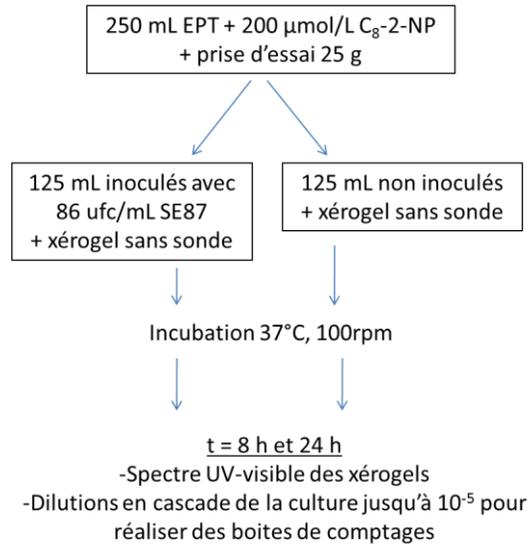
Figure 4.36 : Procédure de détection de *Salmonella* (norme ISO 6579, 2002).

Trois types d'aliments parmi les plus fréquemment contaminés ont été choisis : une mayonnaise à base de jaune d'œuf, un camembert à base de lait cru et de la viande de poulet crue. L'objectif est de voir s'il est possible de mettre en évidence la présence de *Salmonella* dans ces échantillons *via* la dégradation du substrat 2-nitrophényl caprylate (C<sub>8</sub>-2-NP) et la libération de 2-nitrophénol.

**Mayonnaise** La mayonnaise est la même que celle utilisée au chapitre 2. La première étape de la méthode ISO 6579, à savoir l'enrichissement non sélectif, a été réalisée. La Figure 4.37 détaille le protocole suivi : une prise d'essai de 25 g est diluée dans 250 mL de milieu riche (Eau Peptonée Tamponnée, EPT, bioMérieux ref 51094), auquel est ajouté le substrat enzymatique (C<sub>C8\_2\_NP</sub> = 200 µmol/L). Le mélange est homogénéisé 1 min dans un sac *Stomacher* à l'aide d'un broyeur Mixwel (Awel Innovations).

Le contenu du sac est divisé en deux fractions de 125 mL. Une des fractions est inoculée avec des salmonelles (*Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis*, ATCC 13076, **SE87**, charge bactérienne initiale : 86 ufc/mL) et l'autre non. Un xérogel sans sonde avec un ratio molaire de 0,15 d'ABTES, de 0,8 mm d'épaisseur, est placé au-dessus de chacune de ces fractions.

Après 8 h et 24 h de culture, un spectre d'absorbance UV-visible des xérogels est acquis pour surveiller la production de 2-nitrophénol et un échantillon de la culture est prélevé et dilué par décades pour estimer la population bactérienne. Chaque décade est étalée à la fois sur des boîtes de TSA (Tryptic Soy Agar), et sur une gélose contenant du thiosulfate de sodium et du chlorure de fer (III), afin d'estimer la proportion de salmonelles par rapport à d'autres bactéries (flore locale des échantillons). Les spectres UV-visible des xérogels et la charge bactérienne après 8 h et 24 h sont donnés dans la Figure 4.38.



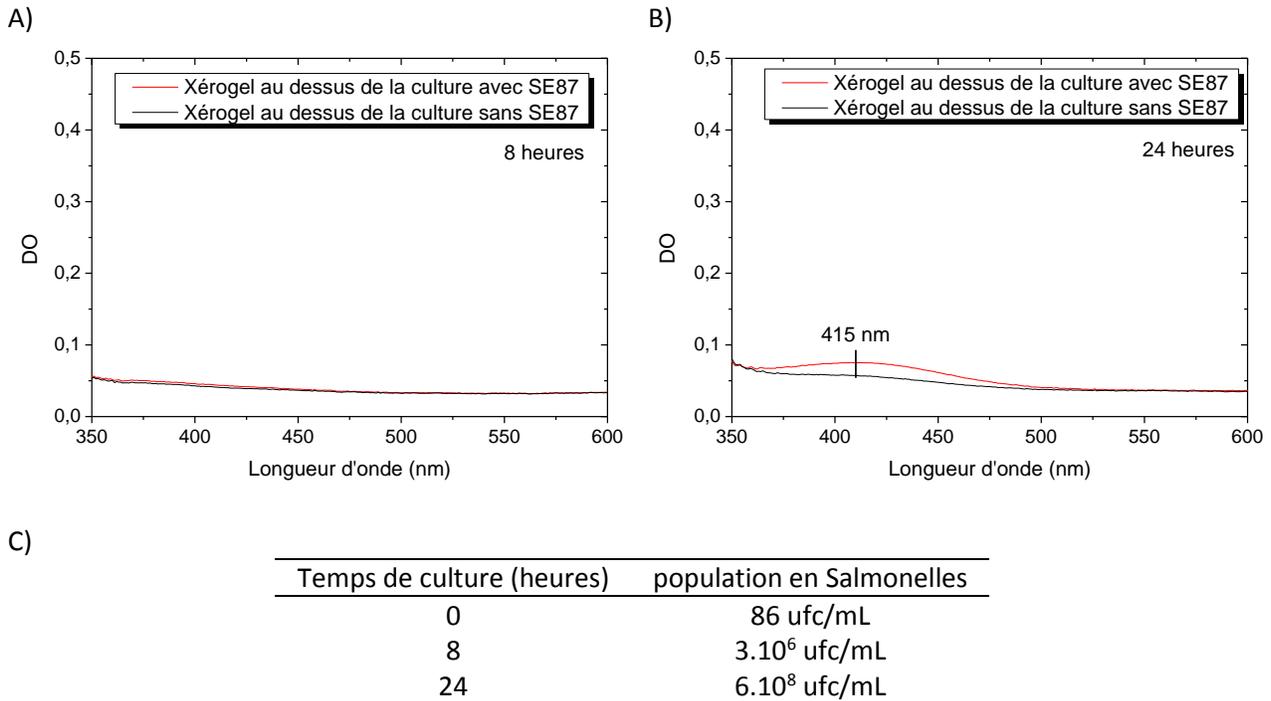
**Figure 4.37 : Protocole pour la mise en évidence de *Salmonella* dans de la mayonnaise lors de l'étape d'enrichissement non sélectif.**

Après 8 h de culture, les xérogels n'ont pas changé de couleur (Figure 4.38.A), mais après 24 h le xérogel sans sonde placé au-dessus de la culture avec *Salmonella* est devenu très légèrement jaune suite à l'accumulation de 2-NP (Figure 4.38), alors que le monolithe au-dessus du témoin n'a pas changé de couleur.

Grâce à l'absorbance à 415 nm et aux dimensions du xérogels, il est possible d'estimer la quantité de 2-NP accumulée ; elle est très faible ( $5,7 \cdot 10^{-10}$  mol) par rapport à la quantité totale de substrat introduit, donc de 2-NP potentiellement disponible ( $2,5 \cdot 10^{-5}$  mol). La vérification des charges bactériennes après 8 h et 24 h de culture (Figure 4.38.C) permet de constater que le disulfite de potassium n'a pas empêché la croissance bactérienne. La forte teneur en lipides (>76%) est la raison avancée pour expliquer cette faible quantité de 2-NP capturé. Deux phénomènes peuvent apparaître :

- En plus des lipides, une grande quantité d'amphiphiles est présente dans le milieu : la lécithine, protéine de l'œuf, et le TWEEN 20 ajouté pour dissoudre le substrat. Les gouttelettes d'huile et les molécules amphiphiles augmentent l'affinité du 2-NP pour la phase aqueuse.
- L'huile de colza est principalement composée d'acides gras à chaîne carbonée longue ( $C_{16}$  et plus). Ces acides gras sont présents en quantités bien plus importantes dans le milieu de culture

que le substrat C<sub>8</sub>-2-NP. Ils peuvent donc entrer en compétition avec le substrat présent en concentration plus faible (200 µmol/L).



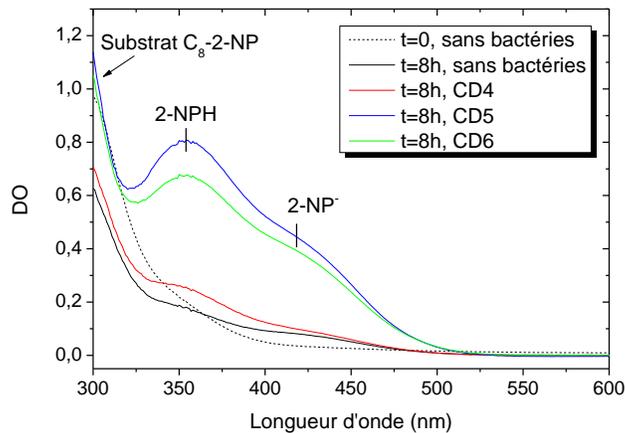
**Figure 4.38 : Spectres UV-visibles des xérogels sans molécule sonde au-dessus des cultures contenant le substrat C<sub>8</sub>-2-NP A) après 8 heures d'enrichissement, B) après 24 heures d'enrichissement. C) Charge bactérienne en salmonelles après différents temps de culture.**

Nous avons vérifié par étalement sur géloses au sang et cultures en milieu aérobie et anaérobie que la mayonnaise employée est une matrice sans flore locale. Les salmonelles ajoutées ont pu y être mises en évidence dès l'étape d'enrichissement non sélectif grâce à deux voies enzymatiques : la réduction de thiosulfate (Chapitre 2) et l'hydrolyse d'un ester avec une chaîne octanoate (Figure 4.38). Ces voies ont libéré deux COV différents : le sulfure d'hydrogène et le 2-nitrophénol respectivement. La principale difficulté est inhérente à la composition chimique de la matrice et particulièrement à sa forte teneur en lipides.

**Viande de poulet crue** Dans le chapitre 2, nous avons mis en évidence qu'au moins une des souches de la flore locale de la viande est capable de produire du sulfure d'hydrogène à partir de thiosulfate. Un test H<sub>2</sub>S fournirait donc de faux positifs. Pour éviter cela, la voie C<sub>8</sub>-estérase a donc été envisagée.

Un test C<sub>8</sub>-estérase a été réalisé sur 3 souches de la flore locale de la viande (notées CD4, CD5, CD6), afin de savoir si elles sont capables ou non d'hydrolyser le substrat C<sub>8</sub>-2-NP. Pour cela, une charge bactérienne de 0,5 McF est introduite dans de l'EPT contenant 200 µmol/L de substrat C<sub>8</sub>-2-NP. Un spectre UV-visible des milieux de culture est acquis après incubation pendant 8 h à 37°C. La Figure 4.39 présente les résultats obtenus. Deux conclusions peuvent être tirées :

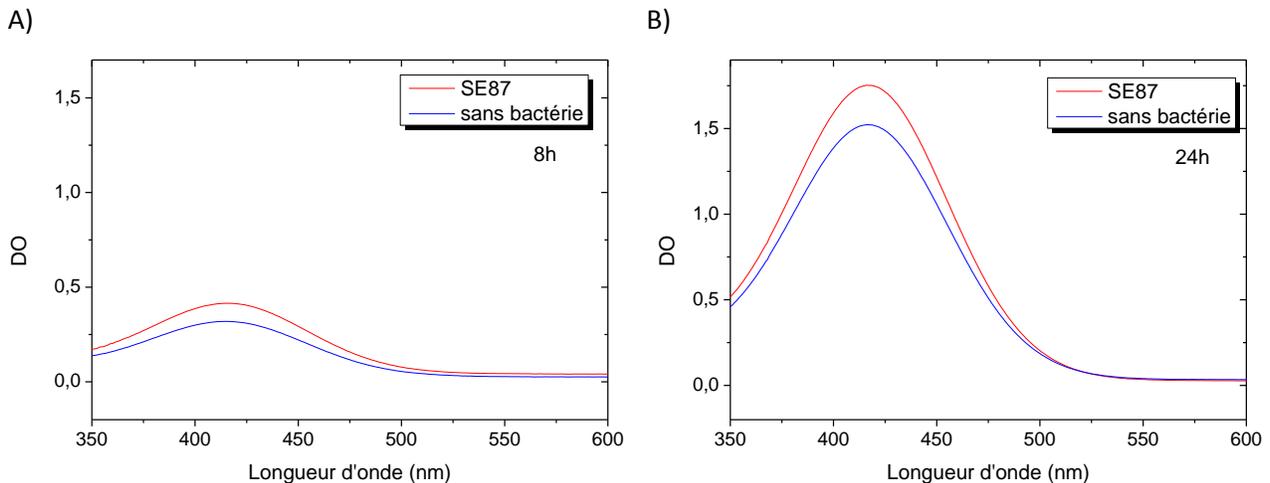
- D'une part, deux souches, CD5 et CD6, sont capables d'hydrolyser le substrat enzymatique : les spectres UV-visible des milieux qui ont contenu ces souches présentent les deux pics caractéristiques du 2-nitrophénol (360 nm) et du 2-nitrophénolate (415 nm). Les deux formes sont présentes en solution car l'EPT est tamponné à pH = 7,4.
- D'autre part, la courbe noire qui représente l'absorbance du milieu de culture avec substrat enzymatique et sans bactéries après 8 h à 37°C présente deux pics très légers à 360 nm et 415 nm. Une petite fraction du substrat enzymatique a donc été hydrolysée à 37°C en l'absence de bactéries.



**Figure 4.39 : Spectres UV-visible des milieux de culture contenant le substrat C<sub>8</sub>-2-NP, mis en présence ou non de bactéries de la flore locale de la viande. Les 3 souches (CD4, CD5, CD6) isolées de cette flore locale n'ont pas été identifiées.**

Comme pour la mayonnaise, l'étape d'enrichissement non sélectif a été réalisée (le protocole est le même qu'en Figure 4.37). Après 8 h et 24 h de culture, un spectre d'absorbance UV-visible des xérogels est acquis pour surveiller la production de 2-NP. Les spectres sont représentés dans la Figure 4.40.

Sans surprise, que ce soit en présence ou non de *Salmonella*, les capteurs ont accumulé du 2-nitrophénol (pic caractéristique à 415 nm). En effet, même en l'absence de salmonelles, le substrat est hydrolysé par les bactéries de la flore locale de la viande. Dans ce cas, une détection dès l'étape d'enrichissement non sélectif est impossible. Une solution est d'utiliser un milieu sélectif qui permette de favoriser la croissance des salmonelles par rapport à la flore locale. Cette approche est envisagée dans la troisième matrice alimentaire étudiée : le camembert au lait cru.



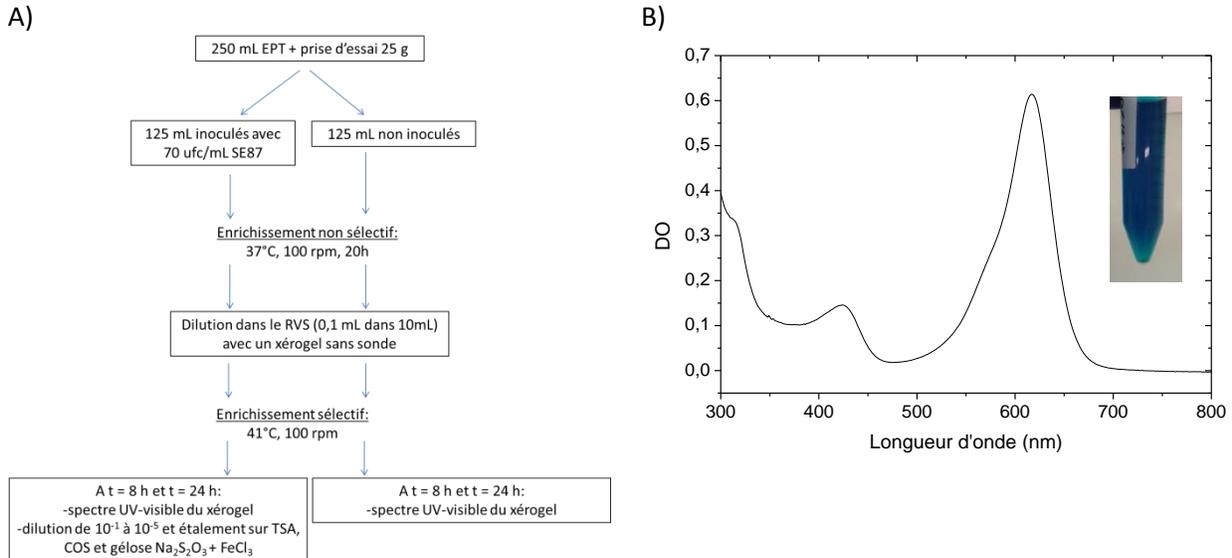
**Figure 4.40 : Spectres UV-visibles des xérogels sans molécule sonde au-dessus des cultures contenant le substrat C<sub>8</sub>-2-NP A) après 8 heures d'enrichissement, B) après 24 heures d'enrichissement**

**Camembert au lait cru** Nous avons constaté au chapitre 2 que le camembert contient une flore locale importante. Comme pour la flore locale de la viande, les souches isolées du camembert (CD1, CD2, CD3) ont été mises en présence de substrat C<sub>8</sub>-2-NP (200 µmol/L). Une des trois souches, CD3, est capable d'hydrolyser le substrat C<sub>8</sub>-2-NP.

**Comme une des bactéries de la flore normale du camembert, peut hydrolyser le substrat C<sub>8</sub>-2-NP, il ne sera pas possible de détecter spécifiquement *Salmonella* via l'activité C<sub>8</sub>-estérase dès l'étape d'enrichissement non sélectif, à l'issue de laquelle CD3 est présente en grande quantité.** Il est nécessaire de procéder à un enrichissement sélectif dans un milieu qui favorise la croissance des salmonelles par rapport aux autres micro-organismes, c'est le cas du Rappaport Vassiliadis.

L'expérience est réalisée en suivant les étapes de la norme ISO 6579 (Figure 4.41.A). Le sac *Stomacher* contenant la prise d'essai dans l'EPT (bioMérieux ref 51094) est séparée en deux fractions de 125 mL. Une de ces fractions est inoculée avec 70 ufc/mL (*Salmonella enterica subsp. enterica* serovar *Enteritidis*, ATCC 13076, SE87), l'autre non. Ces fractions sont incubées 20 heures à 37°C, 100 rpm (enrichissement non sélectif). Au cours de cet enrichissement non sélectif, il y a eu croissance à la fois des salmonelles et de la flore locale (CD1, CD2 et CD3).

L'étape suivante est l'enrichissement sélectif : 0,1 mL de ces deux fractions sont dilués dans 10 mL de RVS (Rappaport Vassiliadis, bioMérieux 42-110) auquel est ajouté du substrat enzymatique (C<sub>8</sub>-2-NP = 200 µmol/L, C<sub>TWEEN 20</sub> = 110 µmol/L). Un xérogel sans sonde, avec un ratio molaire de 0,15 en ABTES, de 0,8 mm d'épaisseur, est placé au-dessus de chacune des deux cultures qui sont incubées à 41°C, 100 rpm. La détection en phase gazeuse des produits du métabolisme est indispensable étant donné que le RVS est un milieu très absorbant du fait de la présence de vert de malachite (Figure 4.41.B).

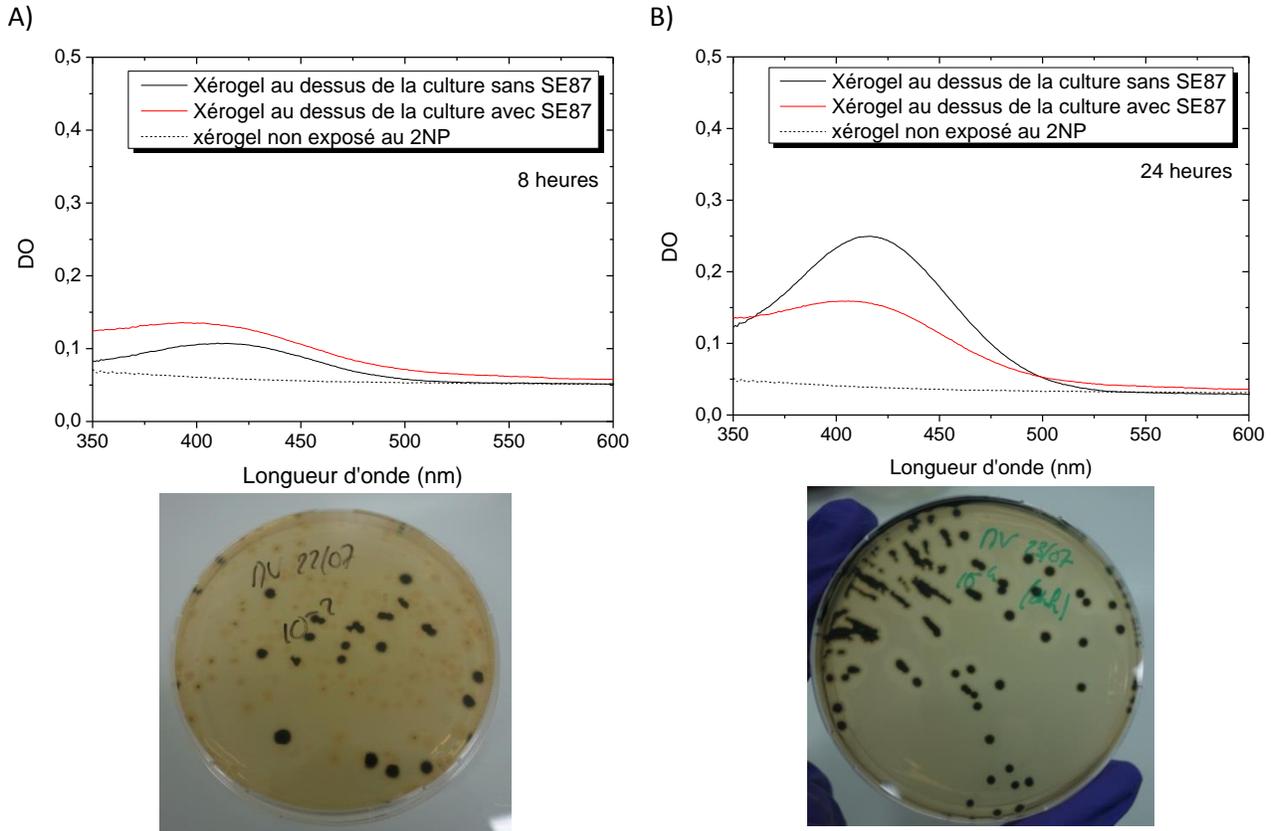


**Figure 4.41 : A) Protocole pour la mise en évidence de *Salmonella* lors de la phase d'enrichissement sélectif. B) Spectre d'absorption UV-visible du RVS avec le substrat C8-2-NP 200 $\mu$ M, dilué par 10, chemin optique : 1cm.**

Après 8 h et 24 h de culture, un spectre des xérogels est acquis pour suivre l'accumulation de 2-nitrophénol issu de l'hydrolyse enzymatique et un échantillon de la culture est prélevé, dilué par décades et étalé sur boîtes de Pétri dans le but d'estimer la population bactérienne. Chaque décade est étalée à la fois sur des boîtes de TSA afin d'estimer la flore totale, et sur une gélose inspirée des géloses XLD, en fait du TSA additionné de thiosulfate de sodium et du chlorure de fer (III). Sur un tel milieu, les salmonelles apparaîtront noires du fait de la production de H<sub>2</sub>S et de la précipitation de Fe<sub>2</sub>S<sub>3</sub>.

Après 8 h de culture dans le RVS, on observe encore sur les géloses plusieurs types de colonies : des salmonelles qui apparaissent noires sur la gélose avec Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> et FeCl<sub>3</sub>, et des colonies issue de la flore locale du camembert qui ne sont pas capables de réduire le thiosulfate et restent blanches (Figure 4.42.A). Les deux xérogels sont légèrement jaunes, sûrement du fait de l'activité C<sub>8</sub>-estérase de CD3.

Après 24 h de culture dans le RVS, les colonies sur la gélose TSA ont toutes le même aspect, et elles apparaissent toutes noires sur la gélose Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> + FeCl<sub>3</sub> (Figure 4.42.B). Il s'agit donc de *Salmonella* SE87, qui est la seule souche restante après 24 h d'enrichissement sélectif. Cependant la présence de salmonelles n'a pas pu être mise en évidence puisque les deux xérogels présentent un pic à 415 nm. L'inhibition de la flore locale dans le RVS est un processus relativement lent puisqu'il reste des bactéries de la flore locale après 8 h de culture. Ces dernières, et en particulier CD3, ont donc eu suffisamment de temps pour hydrolyser significativement le substrat C<sub>8</sub>-2-NP.



**Figure 4.42 : Spectres UV-visibles des xérogels sans molécule sonde au-dessus des cultures d'enrichissement spécifique, dans le RVS avec le substrat C<sub>8</sub>-2-NP, et photographies des boîtes de comptages contenant du Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> et du FeCl<sub>3</sub> A) après 8 h d'enrichissement sélectif, B) après 24 h d'enrichissement sélectif.**

Le Tableau 4.12 donne les populations en flore locale et salmonelles au cours des deux étapes d'enrichissement sélectif et non sélectif. Un milieu complexe comme le camembert présente une difficulté majeure pour la mise en évidence de *Salmonella* via son activité C<sub>8</sub>-estérase : une flore locale abondante, dont une partie est C<sub>8</sub>-estérase positive. L'utilisation d'un milieu sélectif comme le RVS permet de favoriser la croissance de *Salmonella* par rapport aux autres espèces. Cependant, cette sélection n'est pas immédiate puisqu'il reste de la flore locale après 8 h d'enrichissement sélectif. Avant qu'elle soit inhibée, cette flore dégrade le substrat enzymatique.

	Flore totale	SE87
t=0	30.10 <sup>6</sup> ufc/mL	70 ufc/mL
après enrichissement non sélectif 20h dans EPT	~10 <sup>9</sup>	~10 <sup>8</sup>
après 8h enrichissement sélectif dans RVS+C <sub>8</sub> -2-NP	940.10 <sup>3</sup> ufc/mL	37.10 <sup>3</sup> ufc/mL
après 24h enrichissement sélectif dans RVS+C <sub>8</sub> -2-NP	0	27,4.10 <sup>6</sup> ufc/mL

Tableau 4.12 : Tableau récapitulatif des populations en flore totale et salmonelles à différents temps d'enrichissement sélectif.

### 6.3.2 Détection de *S. aureus*

Les *S. aureus* sont les plus représentés du genre *Staphylococcus* dans les toxi-infections alimentaires. Les entérotoxines staphylococciques sont des protéines produites par les staphylocoques producteurs de coagulase. Présentes en quantité suffisante dans l'aliment, ces toxines sont susceptibles de déclencher une intoxication. La contamination des aliments peut être humaine par contact direct ou indirect (25 à 35% des individus sains sont porteurs de *S. aureus*, sur la peau ou les muqueuses [34]), ou animale par contamination des matières premières. *S. aureus* peut être isolé dans des aliments très variés. Ceux ayant nécessité une manipulation humaine sont les plus fréquemment associés aux intoxications à *S. aureus*. [35] La recherche des staphylocoques se fait selon la norme NF EN ISO 6888 (Figure 4.43). Elle consiste à réaliser une prise d'essai et à la diluer sur plusieurs décades. Deux boîtes de comptages par dilution sont réalisées sur des géloses Baird-Parker, un milieu décrit pour la première fois en 1962. [36] Il contient du tellurite de potassium et du jaune d'œuf qui rend le milieu jaune et opaque. Il se forme un halo clair autour des colonies de *S. aureus*, suite à l'hydrolyse des protéines de l'œuf. Eventuellement, un liseré blanc peut apparaître dû à la précipitation des acides gras issus de l'action de la lécithinase sur la lécithine du jaune d'œuf. Enfin, le tellurite de potassium inhibe les Gram- et est réduit en tellure, d'où la coloration noire des colonies.

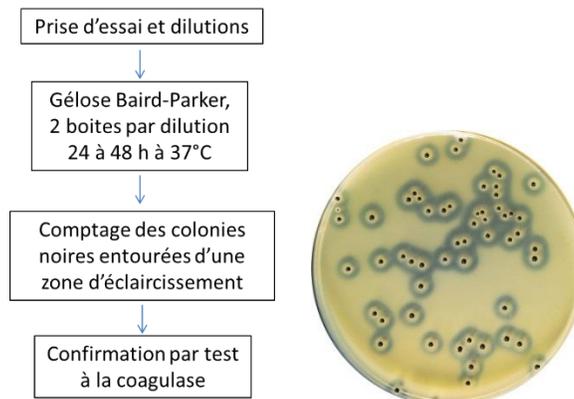


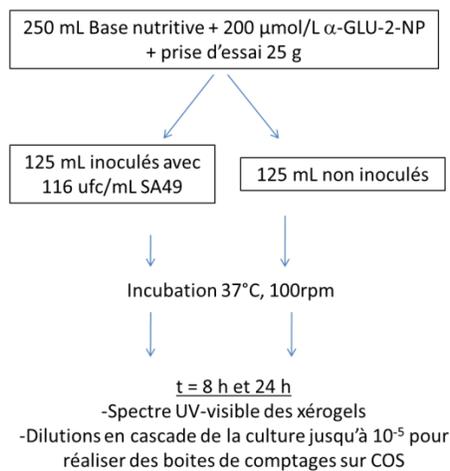
Figure 4.43 : Méthode de référence pour le dénombrement de *S. aureus* dans les matrices alimentaires (ISO 6888) et photographie de colonies de *S. aureus* sur une gélose Baird-Parker. [37]

Pour un premier test, nous avons utilisé la même mayonnaise que pour la détection de *Salmonella*.

Le protocole utilisé est le même que pour la mise en évidence de *Salmonella* ; il est détaillé en Figure 4.44 : une prise d'essai de 25 g de mayonnaise est diluée dans 250 mL de milieu riche (base nutritive, composition détaillée en Annexe 7.6) auquel est ajouté le substrat enzymatique 2-nitrophényl- $\alpha$ -glucopyranoside ( $C_{\alpha\text{-GLU-2-NP}} = 200 \mu\text{mol/L}$ ) dans un sac *Stomacher* qui est agité vigoureusement.

Le contenu du sac est divisé en deux fractions de 125 mL. Une des fractions est inoculée avec *S. aureus* (*Staphylococcus aureus*, ATCC 6571, **SA49**, charge bactérienne initiale : 116 ufc/mL) et l'autre non. Un xérogel sans sonde avec un ratio molaire de 0,15 d'ABTES, de 0,8 mm d'épaisseur, est placé au-dessus de chacune de ces fractions.

Après 8 h et 24 h de culture, un spectre des xérogels est acquis pour surveiller la production de 2-nitrophénol et un échantillon de la culture est prélevé et dilué par décades dans le but d'estimer la population bactérienne. Chaque décade est étalée sur des boîtes de TSA (Tryptic Soy Agar).



**Figure 4.44 : Protocole pour la mise en évidence de *S. aureus* dans une matrice alimentaire via son activité  $\alpha$ -glucosidase.**

Dans une matrice sans flore locale et sans activité  $\alpha$ -glucosidase intrinsèque, comme la mayonnaise, la détection de *S. aureus* est aisée malgré la teneur élevée en lipides de la matrice. En effet dès 8 h d'incubation, le xérogel au-dessus de la culture avec *S. aureus* est devenu jaune (pic d'absorbance caractéristique à 415 nm) suite à la croissance de la bactérie et à l'hydrolyse du substrat  $\alpha$ -GLU-2-NP (Figure 4.45).

Lors de l'expérience de détection de *Salmonella* via son activité  $C_8$ -estérase dans la mayonnaise l'absorbance dans les xérogels n'avait pas dépassé 0,1 (Figure 4.38). Cette fois ci, le 2-NP a été détecté en plus grande quantité : l'absorbance dans les xérogels atteint 0,33 (Figure 4.45). La forte concentration en lipides et en molécules amphiphiles dans le milieu de culture a donc un impact limité sur le transfert du 2-NP en phase gazeuse. Lors de l'expérience avec *Salmonella*, le substrat  $C_8$ 2-NP a dû entrer en compétition avec les autres acides gras qui ont une structure similaire, et n'être que partiellement hydrolysé.

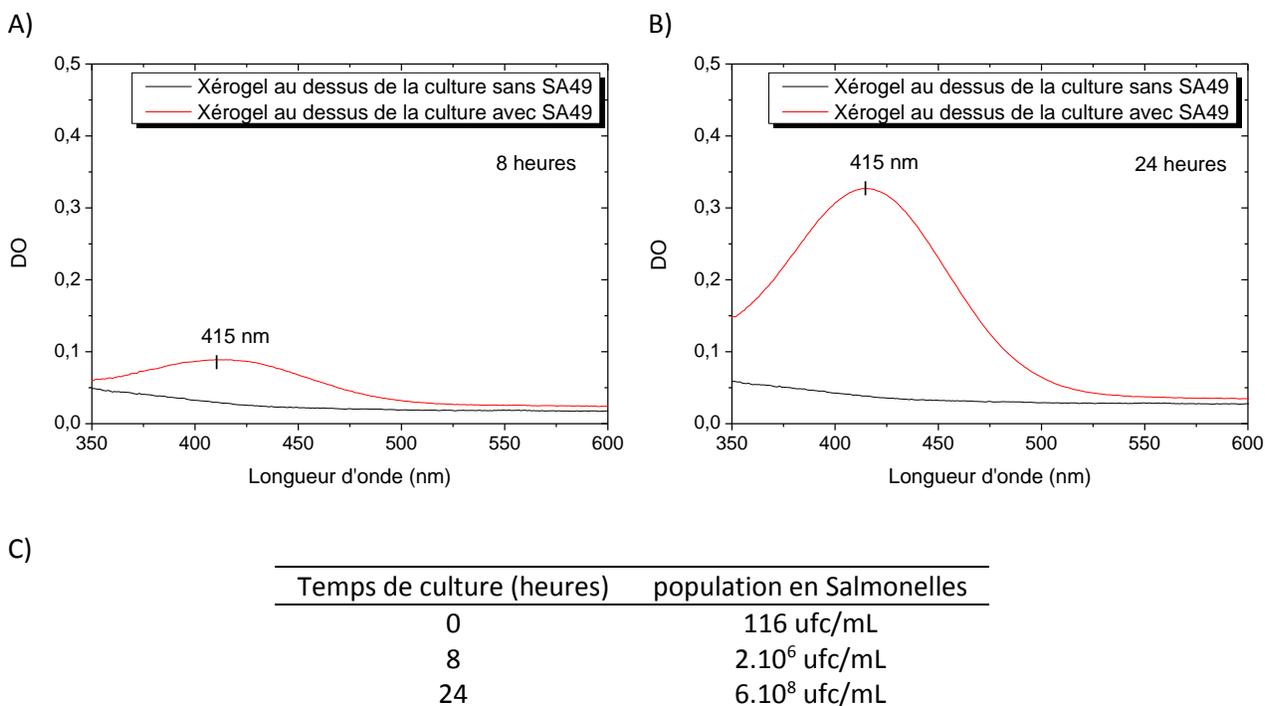


Figure 4.45 : Spectres UV-visibles des xérogels sans molécule sonde au-dessus des cultures contenant le substrat  $\alpha$ -GLU-2-NP (chemin optique 0,8 mm) A) après 8 h d'enrichissement, B) après 24 h d'enrichissement. C) Charge bactérienne en *S. aureus* après différents temps de culture.

Alors que la méthode de référence ISO 6888 avec isolement sur gélose Baird-Parker requiert 24 à 48 h, il est possible de mettre en évidence en moins de 8h la présence de *S. aureus* dans un échantillon alimentaire sans flore locale et sans activité enzymatique intrinsèque, grâce à son activité  $\alpha$ -glucosidase. Cette étape peut être directement suivie par un test de confirmation à la coagulase.

## Conclusion

Au cours de ce chapitre, nous nous sommes intéressés à la détection d'un composé volatil exogène : le 2-nitrophénol pour la mise en évidence de deux activités glycosidases ( $\beta$ -glucuronidase et  $\alpha$ -glucosidase) spécifiques de *E. coli* et *S. aureus* respectivement et d'une activité estérase ( $C_8$ -estérase) spécifique de *Salmonella*.

Le 2-nitrophénol est piégé et mis en évidence dans les xérogels grâce à son absorbance à 415 nm sans molécule sonde sous sa forme phénolate. Un travail sur la composition des capteurs a permis d'augmenter d'un facteur 80 la quantité de phénolate capturé par rapport à la formulation de départ. En mesurant l'absorbance à travers 5 xérogels, **une concentration de 2  $\mu$ mol/L de 2-nitrophénol en phase liquide a pu être détectée en quelques minutes seulement**. En appliquant la loi de Henry, cette concentration correspond à **28 ppb** de 2-nitrophénol en phase gazeuse. Cette limite de détection a été obtenue avec une instrumentation bien moins coûteuse et une technique bien plus simple à mettre en œuvre que la SPME-GC-MS (limite de détection : 12  $\mu$ mol/L). [14]

Ces capteurs ont été utilisés pour la détection de 2-nitrophénol issu d'activités enzymatiques dans des milieux complexes. Les applications visées sont la recherche de pathogènes dans le sang (hémocultures) et dans les matrices alimentaires. Nous avons ainsi pu mettre en évidence plusieurs difficultés inhérentes à ces milieux.

**L'activité enzymatique intrinsèque des échantillons.** Le sang contient des enzymes, dont l'activité est plus ou moins élevée : elle est bien plus importante pour l'activité  $\alpha$ -glucosidase que pour la  $\beta$ -glucuronidase. De ce fait, il a été possible de détecter aisément *E. coli*, jusqu'à 0,5 ufc/mL en 11 h, alors que *S. aureus* n'a pas pu être détecté. En effet, l'activité  $\alpha$ -glucosidase du sang était trop importante. Toutefois nous proposons une piste prometteuse pour réduire cette activité enzymatique intrinsèque, reposant sur un inhibiteur d' $\alpha$ -glucosidase.

**La flore locale de l'échantillon.** Qu'il s'agisse d'échantillons alimentaires ou cliniques, certaines souches de la flore locale peuvent présenter l'activité enzymatique ciblée. Par exemple, nous avons remarqué que l'activité  $\alpha$ -glucosidase peut se trouver chez certains *S. epidermidis*. Ces bactéries se trouvent fréquemment sur la peau et les muqueuses. Un test  $\alpha$ -glucosidase semble donc peu adapté à la détection de *S. aureus* dans les plaies aiguës ou chroniques. En outre, les échantillons alimentaires peuvent contenir une grande variété de micro-organismes, par exemple, dans la viande testée, deux souches de la flore locale présentaient l'activité  $C_8$ -estérase. L'enrichissement sélectif n'est pas une solution car la flore locale n'est pas inhibée immédiatement et a le temps d'hydrolyser les substrats enzymatiques et de relarguer des quantités significatives de 2-NP.

**Composition chimique des échantillons.** La présence de certaines molécules peut réduire ou retarder l'activité enzymatique du pathogène ciblé en réprimant la transcription du gène. C'est le cas du glucose qui, par répression catabolique, réprime l'expression du gène codant pour la  $\beta$ -glucuronidase. Cela concerne aussi bien les échantillons cliniques qu'alimentaires. Certaines molécules présentes naturellement dans la matrice peuvent aussi entrer en compétition avec le substrat enzymatique osmogène ; en particulier, lorsqu'elles sont chimiquement similaires au substrat. C'est le cas des lipides en grande quantité dans la mayonnaise (76%), qui entrent en compétition avec les 200  $\mu$ mol/L de substrat  $C_8$ -2-NP. Dernier phénomène, une fois le substrat hydrolysé et le COV libéré, son transfert de masse entre la phase liquide et la phase gaz peut être entravé. C'est le cas lorsqu'un colloïde comme une émulsion (mayonnaise) ou des cellules (cellules sanguines) adsorbe le COV. Il en est de même lorsque des espèces amphiphiles vont accroître l'affinité du COV pour la phase aqueuse.

Dans les chapitres 2, 3 et 4, la lecture de l'absorbance des xérogels se fait en transmission. Soit les capteurs sont sortis de leur environnement pour acquérir un spectre UV-visible, soit la lecture de l'absorbance se fait en continu à travers plusieurs xérogels superposés au-dessus d'une culture dans le montage mis en place au chapitre 2. La suite du travail s'intéresse à une mise en forme originale des xérogels pour faciliter un suivi en continu de leur absorbance, ce qui autorise des temps de détection plus courts des pathogènes.

## Références bibliographiques

- [1] *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, David R. Lide. CRC Press, 2005.
- [2] R. A. Ando, A. C. Borin, and P. S. Santos, "Saturation of the Electron-Withdrawing Capability of the NO<sub>2</sub> Group in Nitroaromatic Anions: Spectroscopic and Quantum-Chemical Evidence," *J. Phys. Chem. A*, vol. 111, no. 30, pp. 7194–7199, Aug. 2007.
- [3] R. Sander, "Compilation of Henry's law constants, version 3.99," *Atmospheric Chem. Phys. Discuss.*, vol. 14, no. 21, pp. 29615–30521, Nov. 2014.
- [4] P. R. Marcoux, M. Dupoy, R. Mathey, A. Novelli-Rousseau, V. Heran, S. Morales, F. Rivera, P. L. Joly, J.-P. Moy, and F. Mallard, "Micro-confinement of bacteria into w/o emulsion droplets for rapid detection and enumeration," *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 377, no. 1–3, pp. 54–62, Mar. 2011.
- [5] D. Mercier, F. Pereira, C. Méthivier, P. Montméat, L. Hairault, and C.-M. Pradier, "Elaboration, activity and stability of silica-based nitroaromatic sensors," *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 15, no. 31, p. 12911, 2013.
- [6] "http://www.chemspider.com." consulté le 17/07/2015.
- [7] H. Gilman and L. S. Miller, "The Determination of Silanols with the Karl Fischer Reagent1," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 73, no. 5, pp. 2367–2368, May 1951.
- [8] J. P. Kosonen and J. K. Ruohonen, "A simple Karl Fischer titration procedure for determination of total hydroxyl content in silanol-terminated polysiloxanes," *Int. J. Polym. Anal. Charact.*, vol. 4, no. 4, pp. 283–293, 1998.
- [9] S. Monredon-Senani, "Interaction Organosilanes/Silice de précipitation Du milieu hydro-alcoolique au milieu aqueux," Thèse de doctorat, Université Paris 6, soutenue le 7/12/2004, 2004.
- [10] G. E. Kellum and R. C. Smith, "Determination of water, silanol, and strained siloxane on silica surfaces," *Anal. Chem.*, vol. 39, no. 3, pp. 341–345, Mar. 1967.
- [11] Wiliam Bamogo, "Capteurs chimiques à base de matrices nanoporeuses pour la détection de métabolites volatils de la tuberculose," Thèse de doctorat, Université Paris 11, soutenue le 20/01/2015, 2015.
- [12] L. L. Hench and M. J. R. Wilson, "Processing of gel-silica monoliths for optics: Drying behavior of small pore gels," *Proc. Fifth Int. Workshop Glas. Ceram. Gels*, vol. 121, no. 1–3, pp. 234–243, May 1990.
- [13] L.-H. Guillemot, "Capteurs chimiques à base de matrices synthétisées par voie sol-gel et à transduction optique pour la détection de composés organiques volatils microbiens (mCOV)," Thèse de doctorat, Université Paris-Sud, soutenue le 19/10/2012.
- [14] E. Tait, J. D. Perry, S. P. Stanforth, and J. R. Dean, "Bacteria detection based on the evolution of enzyme-generated volatile organic compounds: Determination of *Listeria monocytogenes* in milk samples," *Anal. Chim. Acta*, vol. 848, pp. 80–87, Oct. 2014.
- [15] A. L. Demain, "Increasing enzyme production by genetic and environmental manipulations," *Methods Enzymol.*, vol. 22, no. C, pp. 86–95, 1971.
- [16] J. D. Perry and A. M. Freydière, "The application of chromogenic media in clinical microbiology: Application of chromogenic media," *J. Appl. Microbiol.*, vol. 103, no. 6, pp. 2046–2055, Jul. 2007.
- [17] B. Brown, A. Fourneron, R. Deschomets, M. T. Lescure, and T. Sofia, "Evaluation of the automated TEMPO system for enumeration of *Escherichia coli* in food products." biomérieux USA.
- [18] I. Borde, "La régulation de l'opéron lactose, <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/operonlactose/>." Consulté le 11/08/15.
- [19] S. Malhotra-Kumar, K. Haccuria, M. Michiels, M. Ieven, C. Poyart, W. Hryniewicz, and H. Goossens, "Current Trends in Rapid Diagnostics for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and

- Glycopeptide-Resistant Enterococcus Species," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 46, no. 5, pp. 1577–1587, May 2008.
- [20] G. Zambardi and J.-M. Roche, "Reaction medium for methicilin-resistant staphylococcus aureus (MRSA) bacteria," WO2011018589 A2, 2011.
- [21] S. G. Bradley and D. C. Creevy, "Induction and inhibition of  $\alpha$ -glucosidase synthesis in *Candida stellatoidea*," *J. Bacteriol.*, vol. 81, no. 2, p. 303, 1961.
- [22] U. Guntermann, I. Tan, and A. Hüttermann, "Induction of alpha-glucosidase and synthesis during the cell cycle of *Myxobacter AL-1*," *J. Bacteriol.*, vol. 124, no. 1, pp. 86–91, 1975.
- [23] S. Gilbert, C. Roger-Dalbert, and S. Orenga, "Procédé et milieu de détection/identification de bactéries à activité estérasiq," FR 2 816 956 A1, 2002.
- [24] "The HLB SYSTEM a time-saving guide to emulsifier selection." CHEMMUNIQUE, publication of ICI Americas Inc, 1997.
- [25] G. S. Martin, D. M. Mannino, S. Eaton, and M. Moss, "The Epidemiology of Sepsis in the United States from 1979 through 2000," *N. Engl. J. Med.*, vol. 348, no. 16, pp. 1546–1554, Apr. 2003.
- [26] B. Lamy, "Automates pour hémoculture an 2005," *BioTribune Mag.*, vol. 16, no. 1, pp. 35–40, 2005.
- [27] P. Casier, "Panorama des automates de laboratoires," *ITBM-RBM News*, pp. 11–35, 2004.
- [28] A. Visbecq, "Bactériémies, Un défi à l'hôpital." La lettre de l'infectiologue, de la microbiologie à la clinique, Edimark, Décembre-2011.
- [29] S. Orenga, A. L. James, M. Manafi, J. D. Perry, and D. H. Pincus, "Enzymatic substrates in microbiology," *J. Microbiol. Methods*, vol. 79, no. 2, pp. 139–155, Nov. 2009.
- [30] L.-H. Guillemot, M. Vrignaud, P. R. Marcoux, C. Rivron, and T.-H. Tran-Thi, "Facile and fast detection of bacteria via the detection of exogenous volatile metabolites released by enzymatic hydrolysis," *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 15, no. 38, p. 15840, 2013.
- [31] T. C. Thorpe, M. L. Wilson, J. E. Turner, J. L. DiGuiseppi, M. Willert, S. Mirrett, and L. B. Reller, "BacT/Alert: an automated colorimetric microbial detection system.," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 28, no. 7, pp. 1608–1612, 1990.
- [32] A. E. Martin and P. A. Montgomery, "Acarbose: an alpha-glucosidase inhibitor," *Am. J. Health-Syst. Pharm. AJHP Off. J. Am. Soc. Health-Syst. Pharm.*, vol. 53, no. 19, pp. 2277–2290; quiz 2336–2337, Oct. 1996.
- [33] J. M. Brogard, B. Willemin, J. F. Blicklé, A. M. Lamalle, and A. Stahl, "Inhibiteurs des alpha-glucosidases: une nouvelle approche thérapeutique du diabète et des hypoglycémies fonctionnelles," *Rev. Médecine Interne*, vol. 10, no. 4, pp. 365–374, Jul. 1989.
- [34] H. Grundmann, D. M. Aanensen, C. C. van den Wijngaard, B. G. Spratt, D. Harmsen, A. W. Friedrich, and the European Staphylococcal Reference Laboratory Working Group¶, "Geographic Distribution of *Staphylococcus aureus* Causing Invasive Infections in Europe: A Molecular-Epidemiological Analysis," *PLoS Med*, vol. 7, no. 1, p. e1000215, Jan. 2010.
- [35] Fiche de l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire Alimentation, Environnement, Travail (ANSES), "Staphylococcus aureus et entérotoxines staphylococciques." .
- [36] A. C. Baird-Parker, "An Improved Diagnostic and Selective Medium for Isolating Coagulase Positive Staphylococci," *J. Appl. Bacteriol.*, vol. 25, no. 1, pp. 12–19, Apr. 1962.
- [37] Biokar diagnostics, "Fiche technique Gélose Baird Parker pour recherche et dénombrement de *Staphylococcus aureus*, [www.biokar-diagnostics.fr](http://www.biokar-diagnostics.fr)." consulté le 28/07/2015.



## Chapitre 5. Mise en forme des xérogels pour une lecture en réflexion

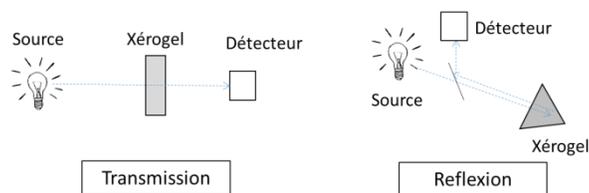
---

<b>CHAPITRE 5. MISE EN FORME DES XEROGELS POUR UNE LECTURE EN REFLEXION .....</b>	<b>167</b>
1. LES RETROREFLECTEURS « COINS DE CUBE » .....	169
1.1 Généralités .....	169
1.2 Les réflexions totales dans un coin de cube.....	170
2. LE MOULAGE DES XEROGELS .....	172
2.1 Fabrication des moules.....	172
2.2 Moulage des sols et séchage.....	173
2.3 Réflexion de la lumière par les xérogels rétroreflecteurs .....	174
3. FORMULATION DES GELS : AJUSTEMENT DE L'INDICE DE REFRACTION .....	175
3.1 Cahier des charges .....	175
3.2 Indices de réfraction des xérogels synthétisés au Chapitre 4 .....	176
3.3 Ajustement de l'indice de réfraction avec un sel de zirconium.....	178
3.4 Ajustement de l'indice de réfraction avec des alcoxydes .....	180
3.4.1 Avec acétylacétone .....	182
3.4.2 Avec acide acétique .....	183
3.4.3 Avec acide acétique + une base.....	187
3.4.4 Avec 2-méthoxyéthanol.....	188
4. EXPOSITION DES RETROREFLECTEURS A DU 2-NP GENERE CHIMIQUEMENT .....	194
4.1 Montage expérimental.....	194
4.2 Suivi de la capture de 2-nitrophénol.....	195
4.2.1 Suivi du piégeage de 2-nitrophénol issu d'une solution simple.....	195
4.2.2 Suivi du piégeage de 2-nitrophénol issu d'une solution complexe : le sang de cheval.....	196
5. SUIVI DE LA CAPTURE DE 2-NITROPHENOL GENERE PAR LA DEGRADATION D'UN SUBSTRAT ENZYMATIQUE. ....	197
6. CONCLUSION .....	199
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	201

## 1. Les rétroreflecteurs « coins de cube »

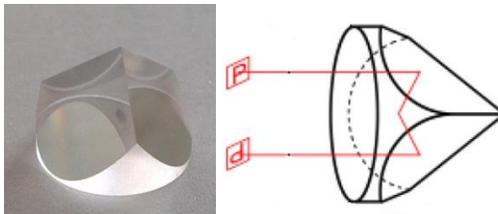
### 1.1 Généralités

Dans les chapitres précédents, la lecture de l'absorption du xérogel se faisait en transmission. Cette configuration a l'inconvénient de devoir maintenir précisément le xérogel entre la source de lumière et le détecteur, ce qui n'est pas pratique pour suivre en continu un xérogel placé dans un environnement confiné comme un flacon d'hémoculture ou un sac *Stomacher*. On peut lever cette difficulté en donnant au xérogel une forme telle qu'il se comporte comme un rétroreflecteur, c'est-à-dire qu'après avoir sondé l'intérieur du matériau, la lumière est renvoyée vers sa source. Une lame semi-réfléchissante dirige alors une partie de la lumière réfléchie vers un détecteur (Figure 5.1). Dans une telle configuration, l'intégralité de l'instrumentation se trouve d'un seul et même côté du xérogel.



**Figure 5.1 : Schéma d'une lecture en transmission et d'une lecture en réflexion**

Un faisceau entrant dans un rétroreflecteur en forme de coin de cube (appelé aussi « prisme trihédral ») subit trois réflexions totales internes sur les trois faces orthogonales (Figure 5.2). Tout rayon entrant, quelle que soit son incidence, est ainsi renvoyé vers sa source. Un miroir réalisera cela uniquement pour des rayons avec une incidence normale. Comme le rétroreflecteur renvoie la lumière vers sa source pour une grande plage angulaire, le dispositif de lecture n'a pas besoin d'être positionné précisément par rapport au rétroreflecteur.



**Figure 5.2 : Photographie d'un rétroreflecteur et schéma des trois réflexions totales internes dans le rétroreflecteur.**

Cette géométrie est mise à profit dans les catadioptres que l'on trouve sur les vélos ou certains panneaux routiers: trois miroirs orthogonaux réfléchissent la lumière vers la source (phare de voiture par exemple). Ce motif de trois miroirs est répété sur toute la surface du catadioptre.

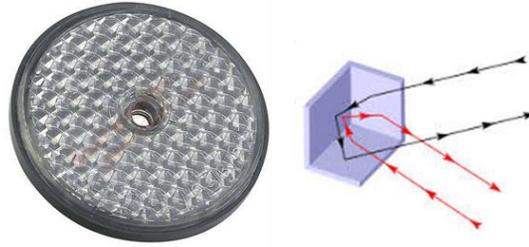


Figure 5.3 : Principe du catadioptré.

Une autre application est la télémétrie Laser-Lune qui a pour objectif de mesurer la distance Terre-Lune. Elle repose sur la mesure du temps mis par un laser émis par une station terrestre pour parcourir le trajet aller-retour entre la Terre et un rétro réflecteur placé sur la surface lunaire. Cinq réflecteurs constitués d'un réseau de coins de cube ont été déposés sur la Lune par les missions Apollo (11, 14 et 15) et Lunakhod (1 et 2) dans les années 1970. En 40 ans, plus de 18000 mesures ont été effectuées. [1]

## 1.2 Les réflexions totales dans un coin de cube

A l'intérieur du coin de cube, la réflexion totale sur les faces du trièdre a lieu pour des rayons qui forment un angle, par rapport aux normales à ces surfaces, supérieur à l'angle critique  $\theta_c$ . Ce dernier dépend de l'indice du matériau :

$$\theta_c(n) = \arcsin\left(\frac{1}{n}\right)$$

L'angle entre les faces arrières du coin de cube et la face avant, par laquelle entrent et sortent les rayons lumineux, est noté  $\alpha$  (l'angle entre les plans ABD et BCD sur la Figure 5.4.A).

$$\alpha = \arctan(\sqrt{2}) = 54,73^\circ$$

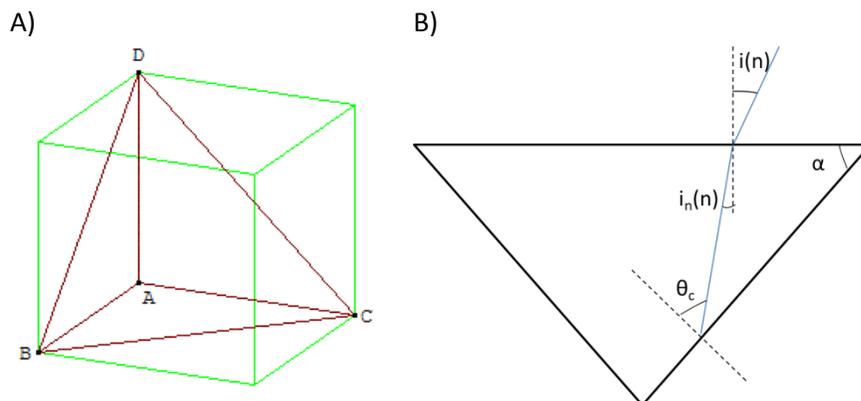


Figure 5.4 : Schémas d'un rétro réflecteur en forme de coin de cube

A l'intérieur du cube, le rayon limite fait un angle  $i_n(n)$  avec la normale à la face avant (Figure 5.4.B) :

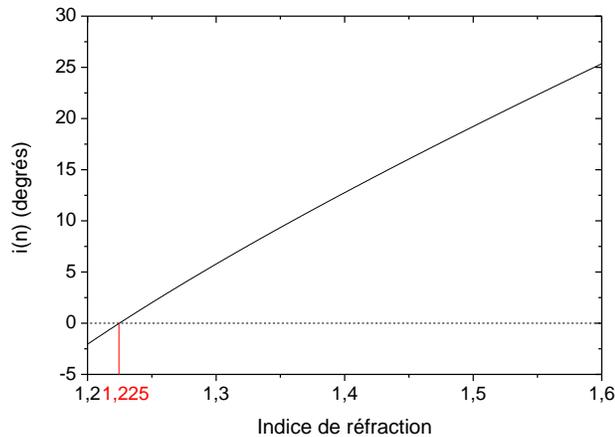
$$i_n(n) = \alpha - \theta_c(n)$$

Par réfraction lors du passage de l'intérieur du cube (indice  $n$ ) à l'extérieur (indice 1), l'angle à l'extérieur du cube est  $i(n)$ , tel que  $\sin(i(n)) = n \sin(i_n(n))$ . On a donc :

$$i(n) = \arcsin \left[ n \cdot \sin \left( \arctan \sqrt{2} - \arcsin \frac{1}{n} \right) \right]$$

Le cas  $i(n_0) = 0$  correspond au cas où l'indice est tel que seul un rayon perpendiculaire à la face d'entrée est réfléchi en tombant sur les faces arrières avec l'angle critique et alors  $\theta_c(n_0) = \alpha$ . C'est le cas pour  $n_0 = \sqrt{\frac{3}{2}} \approx 1,225$ . En conclusion :

- Pour  $n < n_0$ , il ne peut y avoir de réflexion totale sur les 3 faces arrières du coin de cube : il n'y a pas d'effet de rétro réflexion.
- Pour  $n = n_0$  seule l'incidence normale à la face avant permet la rétro réflexion.
- Enfin, lorsque  $n > n_0$ , plus  $n$  augmente et plus la rétro réflexion sera permise dans une large gamme d'incidences : le coin de cube accepte des rayons qui s'écartent de plus en plus de la normale à la face avant avec pour limite  $i(n)$ . La courbe ci-dessous donne les valeurs d'angle d'incidence limite  $i(n)$  pour  $n$  compris entre 1,2 et 1,6 :



**Figure 5.5 : Evolution de l'acceptance angulaire d'un coin de cube rétro réflecteur en fonction de l'indice de réfraction du matériau.**

L'utilisation du rétro réflecteur est donc d'autant plus simple que son acceptation angulaire  $i(n)$  est élevée :

- l'instrumentation s'en trouve simplifiée puisqu'il n'est pas nécessaire de collimater la source lumineuse, ni de placer de manière très précise le rétro réflecteur.
- la quantité de lumière réfléchi sera plus importante, d'où une meilleure sensibilité.

Si on choisit comme critère un angle d'ouverture  $i(n)$  de  $10^\circ$ , le matériau doit avoir un indice  $n$  supérieur à 1,36.

Au cours de ce chapitre, nous avons synthétisé des rétroreflecteurs poreux par voie sol-gel et moulage du sol. Un banc a été mis en place afin de mesurer leur absorbance en réflexion. Les avantages d'une telle géométrie sont les suivants :

- Le chemin optique qui est proportionnel à l'absorbance sera intéressant puisque la lumière effectuera un aller-retour dans le xérogels avec trois réflexions internes. Il est donc allongé par rapport à une lecture en transmission.
- L'intégralité du volume du xérogel est sondé, et en particulier les 3 faces orthogonales sur lesquelles le COV est piégé en premier lieu.
- L'instrumentation est simplifiée puisque la lecture ne nécessite pas d'alignement précis.
- Un tel capteur permet de suivre en continu l'atmosphère d'un flacon sans jamais avoir besoin de l'ouvrir.

## 2. Le moulage des xérogels

### 2.1 Fabrication des moules

Pour obtenir des xérogels de la forme souhaitée, le sol est coulé dans un moule en polysiloxane fermé présentant une cavité de la forme souhaitée. [2] Ce type de matériau présente deux avantages indispensables :

- D'excellentes propriétés de moulage, ce qui permet de reproduire parfaitement les dimensions de l'objet initial. Cette caractéristique est notamment mise à profit dans le domaine de la micro-fluidique pour réaliser des canaux de taille définie. [3]
- Une perméabilité aux gaz et particulièrement aux gaz apolaires. Cela permet d'évacuer les solvants formés au cours des réactions d'hydrolyse et de condensation, à savoir de l'eau et de l'alcool. De nombreux siloxanes fonctionnalisés sont disponibles commercialement, ce qui pourrait permettre dans l'avenir de modifier la cinétique de séchage en fonction de leur capacité à solvater des gaz plus ou moins polaires.

En outre, ces matériaux sont transparents aux rayonnements dans le proche UV (aux longueurs d'ondes supérieures à 240 nm), ce qui rend ce matériau intéressant si l'on souhaite induire par UV la gélification de la solution sol-gel introduite dans le moule. [4][5]

Nous avons utilisé le polydiméthylsiloxane (PDMS) (Dow Corning, Sylgard 184) qui se présente sous la forme d'un kit de deux réactifs :

- une base comprenant un polymère avec, dans sa chaîne principale, un enchaînement de motifs diméthylsiloxanes terminé par des groupes éthyléniques,
- un agent réticulant contenant notamment un tétravinyl siloxane qui permet de former des ponts de réticulation et un catalyseur à base de platine pour catalyser la réaction d'hydrosilylation. [6]

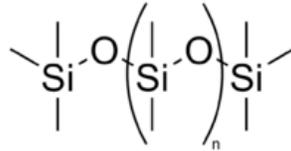


Figure 5.5.6 : formule chimique du polydiméthylsiloxane (PDMS) utilisé pour fabriquer les moules.

Le fournisseur recommande un mélange polymère/réticulant de 10/1. Après mise en contact du mélange avec le coin de cube modèle (Newport, BGR-12.7), la réticulation se fait en chauffant à 80°C pendant une heure. Après réticulation, le moule est ouvert afin de retirer la pièce modèle. Puis des groupements silanols sont générés sur les surfaces à recoller dans un plasma à l'oxygène afin d'obtenir un moule fermé contenant une cavité de la forme du coin de cube modèle. [5][7]

## 2.2 Moulage des sols et séchage

Le sol est injecté dans cette cavité à l'aide d'une seringue et d'une aiguille. Une deuxième aiguille sert d'évent pour chasser l'air contenu dans la cavité. En fonction de sa composition, le sol gélifie plus ou moins rapidement dans la cavité. Après un séchage à 50°C, un xérogel de la forme du coin de cube initial est obtenu. Il présente un rétreint d'un facteur 2 dans toutes les dimensions par rapport à l'objet modèle (Figure 5.7).

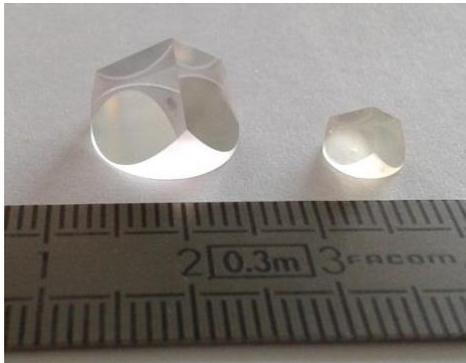
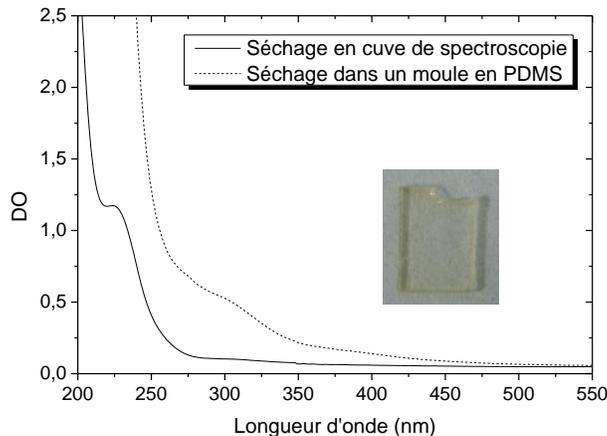


Figure 5.7 : Photographie du rétroreflet commercial qui sert de modèle (à gauche) et d'un rétroreflet obtenu par voie sol-gel après séchage dans un moule silicone (à droite)

Cette méthode de moulage présente plusieurs avantages par rapport à un simple séchage dans un moule classique, tel qu'une cuve de spectrophotométrie par exemple. D'une part, le séchage se fait de manière isotrope sur toutes les faces du gel alors qu'il ne se faisait que par la face supérieure, celle qui est ouverte, dans le cas d'une cuve de spectrophotométrie. D'autre part, il doit être possible de modifier la cinétique du séchage en utilisant des polysiloxanes fonctionnalisés. En particulier, un

polysiloxane moins hydrophobe que le PDMS permettrait d'évacuer plus rapidement l'eau formée lors des réactions de condensation.

Néanmoins cette méthode présente aussi des inconvénients. En premier lieu, comme le moule est formé de matériaux élastomères, une pression d'injection trop forte peut en déformer les faces : elles sont alors bombées et l'angle entre les faces en est modifié. L'injection du sol avec un dispositif contrôlé en pression comme ceux commercialisés par Fluigent pourrait être une solution. [8] En outre, on trouve dans la base polymère du Sylgard 184 une série de composés siliconés volatils dont du tétra(triméthylsiloxy)silane et des oligosiloxanes cycliques. [9][10] **Ces composés volatils sont adsorbés dans le gel au cours du séchage, d'où une couleur jaune des xérogels si le séchage est prolongé.** L'ajout de charbon actif dans le PDMS afin d'absorber ces composés ou le fait de chauffer les moules sous vide n'ont que très peu d'effet. **Un temps de séchage limité à six jours permet d'éviter qu'une forte coloration jaune apparaisse.** La Figure 5.8 compare les spectres d'absorbance de xérogels séchés en cuve et en moule élastomère pendant 14 jours : on peut constater que le mode de séchage a peu d'impact sur la transparence du monolithe tant que l'on se situe au-delà de 400nm.

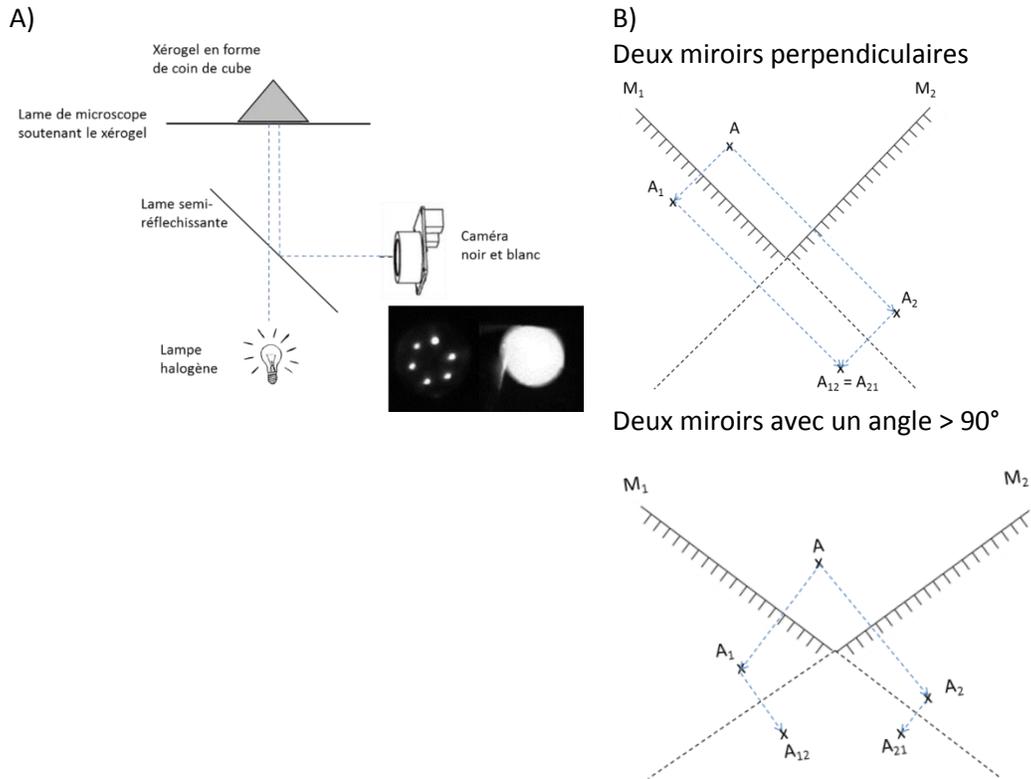


**Figure 5.8 : Spectre UV-visibles de xérogels de 2 mm d'épaisseur dont les ratios molaires sont les suivants : TMOS/MeOH/APTES/H<sub>2</sub>O = 1/5/0,03/4. La photographie montre un xérogel qui a séché dans un moule en PDMS pendant 14 jours et adsorbé des composés siliconés volatils.**

### 2.3 Réflexion de la lumière par les xérogels rétroréflécteurs

Pour observer la lumière réfléchi par les xérogels en forme de coin de cube, ils sont éclairés par une lampe halogène. La lumière réfléchi est envoyée vers une caméra noir et blanc à l'aide d'une lame semi-réfléchissante (Figure 5.9.A). Lorsque les coins de cube ont bien trois faces orthogonales, ils renvoient une image unique de la source. En revanche, lorsque les faces ne sont pas orthogonales ou sont déformées, on observe six images de la source. Pour expliquer ce phénomène, considérons deux miroirs qui se touchent. Un objet (A) aura 2 images : celle obtenue par réflexion sur le miroir 1 puis sur le miroir 2 (A<sub>12</sub>) et celle obtenue par réflexion sur le miroir 2 puis sur le miroir 1 (A<sub>21</sub>). Lorsqu'ils forment un angle de 90°, ces deux images se superposent. Ce n'est plus le cas lorsque l'angle est différent de 90° (Figure 5.9.B). Lorsqu'on considère un système à trois miroirs, un objet A forme d'abord trois images : A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>. Chacune de ces images va en former deux autres à travers les deux autres miroirs : A<sub>123</sub>, A<sub>132</sub>, A<sub>213</sub>,

$A_{231}$ ,  $A_{312}$  et  $A_{321}$ . Ce sont donc six images de la source qui apparaissent lorsque les trois faces ne sont pas orthogonales.



**Figure 5.9 : A) Schéma du montage expérimental utilisé pour observer la lumière réfléchie par les xérogels. La photographie de gauche est l'image obtenue lorsque les trois faces du coin de cube ne sont pas orthogonales. La photographie de droite est la lumière réfléchie par un coin de cube « parfait » avec trois faces orthogonales.**

**B) Images d'un objet formées par deux miroirs formant un angle droit ou un angle  $> 90^\circ$ .**

### 3. Formulation des gels : ajustement de l'indice de réfraction

#### 3.1 Cahier des charges

Les xérogels doivent répondre au même cahier des charges que celui décrit au chapitre 4, avec en outre, une contrainte sur l'indice de réfraction du matériau :

- une surface développée élevée et des pores suffisamment grands pour accueillir des molécules de 2-nitrophénol ;
- une affinité pour le 2-nitrophénol, qui est une molécule assez hydrophobe ;
- un pH intrapore supérieur à 7,2 afin de détecter le 2-nitrophénol sous sa forme déprotonnée c'est-à-dire celle qui a le coefficient d'extinction molaire le plus élevé ( $3500 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$  à 415 nm) ;

- être transparent à la longueur d'onde de lecture, à savoir 415 nm pour le 2-nitrophénolate ;
- un indice de réfraction supérieur à 1,36 afin que le rétrorélecteur obtenu ait un angle d'acceptance d'au moins 10°.
- Une durée de séchage limitée à moins d'une semaine à 50°C afin d'éviter l'accumulation de composés siliconés volatils dans le gel.

### 3.2 Indices de réfraction des xérogels synthétisés au Chapitre 4

Les matériaux sol-gel en silice synthétisés dans le chapitre 4 développent un volume poreux important : entre 0,1 et 0,4 cm<sup>3</sup>/g d'air. L'indice de réfraction de ces matériaux est donc une moyenne entre l'indice de l'air ( $n_{\text{air}} = 1$ ) et celui de la silice ( $n_{\text{silice}} = 1,5$ ). De plus, ces matériaux adsorbent de grandes quantités de vapeur d'eau ( $n_{\text{eau}} = 1,33$ ), qui contribue aussi à l'indice total du matériau.

Les indices de réfraction donnés dans le Tableau 5.1 ont été mesurés sur les matériaux synthétisés au Chapitre 4 grâce à un microscope. La technique est détaillée en Annexe 11. D'une part, plus la quantité d'eau dans les pores est importante, plus l'indice de réfraction augmente. En effet, l'eau ( $n = 1,33$ ) remplace une partie de l'air ( $n = 1$ ), d'où une augmentation de l'indice global du xérogel. D'autre part, pour une même composition, un xérogel qui aura séché à 50°C a un indice de réfraction plus faible qu'un xérogel séché à température ambiante. En effet, lorsqu'un gel est séché à 50°C, nous avons constaté au chapitre 4 grâce aux mesures d'adsorption d'azote que le volume poreux développé est plus élevé : la fraction volumique d'air est plus importante.

	MeOH/APTES = 5/0,03 (séchage à T <sub>amb</sub> )	MeOH/APTES = 5/0,03 (séchage à 50°C)	MeOH/ABTES = 5/0,15 (séchage à T <sub>amb</sub> )	MeOH/ABTES = 10/0,15 (séchage à 50°C)
Séché sous vide à 50°C	1,31 ± 0,01	1,22 ± 0,01	/	1,28 ± 0,01
Atmosphère ambiante (22°C, 53% d'humidité)	1,40 ± 0,01	1,27 ± 0,01	1,361 ± 0,0055 1,36 ± 0,01	1,29 ± 0,01
Exposé au-dessus d'eau, à 37°C	1,42 ± 0,01	1,39 ± 0,01	/	1,43 ± 0,01

**Tableau 5.1 : indices de réfraction mesurés sur différents xérogels après séchage sous vide à 50°C, après une nuit sous atmosphère ambiante et après 1 nuit au-dessus d'eau à 37°C.**

Pour certains xérogels, nous avons comparé l'indice de réfraction mesuré sur xérogel séché (sous vide, 80°C), donc sans contribution de l'eau, avec un indice de réfraction théorique calculé à partir des mesures de volumes poreux obtenues par adsorption d'azote (Tableau 5.2). Grâce au volume poreux et en connaissant le volume et la masse totale du xérogel, il est possible de calculer les fractions volumiques de silice et d'air. L'indice de réfraction théorique est une moyenne entre les indices de l'air et de la silice pondérés par leurs fractions volumiques respectives :

$$n = \Phi_{\text{air}} \cdot n_{\text{air}} + \Phi_{\text{SiO}_2} \cdot n_{\text{SiO}_2}$$

Néanmoins, ce calcul ne tient pas compte du fait que les xérogels synthétisés sont des hybrides inorganiques/organiques, ils sont assimilés à de la silice pure.

	MeOH/APTES = 5/0,03 (séchage à $T_{amb}$ )	MeOH/APTES = 5/0,03 (séchage à 50°C)	MeOH/ABTES = 10/0,15 (séchage à 50°C)
Densité	1,294	1,292	1,095
Volume poreux (adsorption d'azote)	0,305 cm <sup>3</sup> /g	0,571 cm <sup>3</sup> /g	0,395 cm <sup>3</sup> /g
Fraction volumique d'air ( $\Phi_{air}$ )	0,395	0,738	0,432
Fraction volumique de silice ( $\Phi_{SiO_2}$ )	0,605	0,262	0,568
Indices de réfraction mesuré/théorique	1,31/1,30	1,22/1,13	1,28/1,28

Tableau 5.2 : Comparaison des indices de réfraction mesurés et calculés à partir des données d'adsorption d'azote

Ces données nous permettent de constater que ces matériaux, en particulier, celui qui a été retenu au chapitre 4 (MeOH/ABTES = 10/0,15, séchage à 50°C) ont un indice de réfraction insuffisant. Densifier la silice pour augmenter l'indice de réfraction n'est pas une solution car le matériau doit rester poreux pour assurer sa fonction de capteur. Il faut donc ajouter dans le réseau un nouvel élément dont l'oxyde a un indice plus élevé que celui de la silice ( $n = 1,5$ ). Les oxydes de métaux de transition répondent à ce critère, en particulier le dioxyde de titane (TiO<sub>2</sub> anatase,  $n = 2,56$ ) et le dioxyde de zircon (ZrO<sub>2</sub> cubique,  $n = 2,25$ ). [11] Des sols mixtes ont donc été testés, ils sont soit moulés dans des cuves de spectrophotométrie, soit injectés dans des moules en PDMS de manière à obtenir des xérogels parallélépipédiques avec les dimensions suivantes : 15 mm x 10 mm x 2 mm.

Les indices de réfraction des xérogels obtenus ont été mesurés à l'aide d'un microscope : trois mesures sont réalisées sur deux xérogels d'une même formulation. Puis la porosité des xérogels a été caractérisée par adsorption-désorption d'azote afin d'estimer le volume poreux et la surface développée. Enfin, les xérogels ont été exposés à des solutions aqueuses de 2-nitrophénol afin d'évaluer leur capacité à capter le COV.

Plusieurs approches ont été suivies pour synthétiser des oxydes mixtes Si-Zr et Si-Ti :

- L'ajout d'un sel de zircon (l'oxychlorure de zircon (ZrOCl<sub>2</sub>)) dans le sol (paragraphe 3.3). Des xérogels transparents ont été obtenus avec un indice de réfraction satisfaisant ( $n > 1,36$ ). Cependant, l'ajout de ce sel fait chuter le volume poreux des xérogels qui perdent leur propriété de capture des COV.
- L'ajout d'alcoxydes de zircon ou de titane (paragraphe 3.4). Ces alcoxydes ont tendance à réagir très rapidement en présence d'eau et à former un précipité de manière non contrôlée. L'utilisation de ligands chélatants permet de réduire leur sensibilité à l'hydrolyse. Plusieurs ligands ont été utilisés :

-L'acétylacétone (paragraphe 3.4.1), si l'indice de réfraction des xérogels obtenus est satisfaisant, ils ne seront néanmoins pas retenus à cause de leur faible porosité et de leur absorbance élevée à 415 nm

-L'acide acétique (paragraphe 3.4.2 et 3.4.3), les xérogels obtenus répondent bien au cahier des charges. Mais l'ajout d'une base a été nécessaire pour contrebalancer le caractère acide des xérogels obtenus. Ceci afin de détecter le 2-nitrophénol sous sa forme phénolate absorbante à 415 nm.

-Le 2-méthoxyéthanol (paragraphe 3.4.4), qui, contrairement à l'acide acétique, n'acidifie pas les xérogels finaux. Ces xérogels répondent à tous les critères du cahier des charges.

### 3.3 Ajustement de l'indice de réfraction avec un sel de zirconium

**Synthèse des xérogels** Dans un premier temps, l'indice de réfraction des matériaux a été augmenté en ajoutant un sel de zirconium au sol : l'oxychlorure de zirconium ( $ZrOCl_2$ ). Bin *et al* ont synthétisé des gels avec un ratio molaire de zirconium atteignant 20%. L'indice de réfraction des xérogels obtenus varie entre 1,42 et 1,5 et les spectres infrarouges des matériaux mettent en évidence la formation de liaisons Si-O-Zr. [12]

Selon le même principe, nous avons synthétisé des xérogels contenant des quantités variables d'oxychlorure de zirconium. Le sel de zirconium est introduit via une solution méthanolique à 1 mol/L. Le Tableau 5.3 récapitule les ratios molaires utilisés.

La réaction est effectuée à  $-20^{\circ}C$  (bain éthanol/azote liquide). Les réactifs sont introduits dans l'ordre suivant : méthanol, TMOS, solution méthanolique de  $ZrOCl_2$ , APTES et eau. Le sol est versé dans des cuves en plastique de spectrophotométrie (1 mL) et ils gélifient en dix minutes environ. Les cuves sont fermées par un film adhésif poreux (Dominique Dutscher AB0718). Après séchage à  $50^{\circ}C$ , les xérogels obtenus sont transparents sauf ceux de la formulation 5 qui contiennent le ratio molaire d'oxychlorure de zirconium le plus élevé. Dans ce cas, un précipité blanc apparaît à la base des gels au cours du séchage (Figure 5.10).

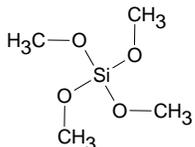
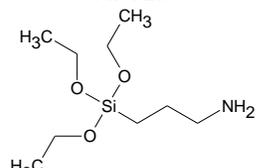
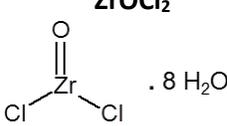
Réactifs	formulation 1	formulation 2	formulation 3	formulation 4	formulation 5
<b>TMOS</b>  <b>CAS 681-84-5</b> <b>Sigma 341436</b>	0,99	0,95	0,9	0,85	0,8
<b>MeOH</b>	5	5	5	5	5
<b>APTES</b>  <b>CAS 919-30-2</b> <b>Sigma A3648</b>	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
<b>ZrOCl<sub>2</sub></b>  <b>CAS 13520-92-8</b> <b>Sigma 224316</b>	0,01	0,05	0,1	0,15	0,2
<b>H<sub>2</sub>O</b>	4	4	4	4	4

Tableau 5.3 : Ratios molaires utilisés pour la synthèse de xérogels mixtes Si-Zr en utilisant l'oxychlorure de zirconium comme source de zirconium.

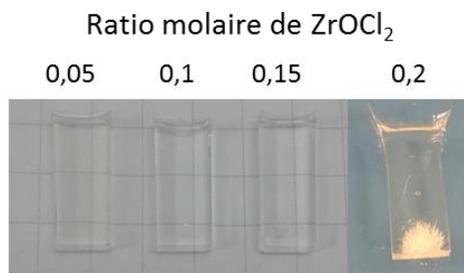


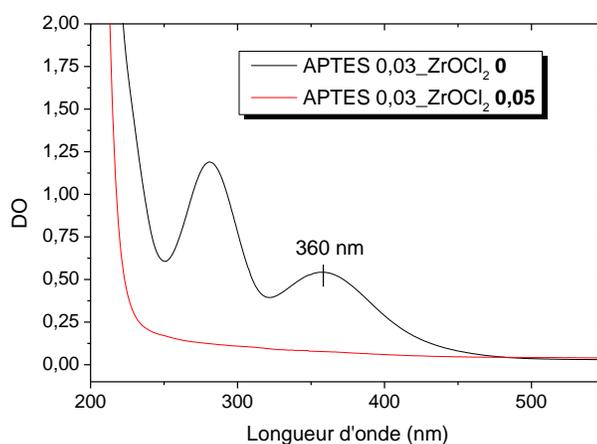
Figure 5.10 : Photographie de xérogels contenant différents ratio molaires d'oxychlorure de zirconium

**Indice de réfraction** L'ajout d'oxychlorure de zirconium permet bien d'augmenter l'indice de réfraction des xérogels, puisque l'indice augmente de 1,25 jusqu'à 1,49 lorsque le ratio de zirconium est de 0,15 (Annexe 12.1).

**Porosité** Après un dégazage à 80°C pendant 48 heures, la porosité des matériaux obtenus a été caractérisée par adsorption-désorption d'azote. Les résultats sont présentés dans l'Annexe 12.1. En présence d'oxychlorure de zirconium, la surface développée et le volume poreux sont réduits

drastiquement : d'un facteur 5 pour la surface BET et d'un facteur 6 pour le volume poreux. En outre, le diamètre des pores est diminué. Cette densification du matériau doit, en partie, participer à l'augmentation de l'indice de réfraction.

**Exposition au 2-NP** Pour évaluer l'impact de la diminution de la porosité sur la capture des COV, un xérogel sans oxychlorure de zircon et un avec (formulation n°2, ratio molaire de  $ZrOCl_2 = 0,05$ ) ont été exposés au-dessus d'une solution aqueuse de 2-nitrophénol selon le protocole décrit en Annexe 6.4 pendant 2 heures. Cette expérience simple nous permet de constater qu'en présence de  $ZrOCl_2$ , aucun pic caractéristique du 2-nitrophénol n'est observé, alors que sans  $ZrOCl_2$  la forme protonnée du 2-nitrophénol est observée dans le xérogel (Figure 5.11). La chute de porosité entraîne donc une moins bonne capture du COV. De ce fait, les xérogels contenant de l'oxychlorure de zircon ne seront pas retenus.



**Figure 5.11 : Spectres UV-visibles de xérogels sans oxychlorure de zircon (APTES 0,03\_ZrOCl<sub>2</sub> 0) et avec oxychlorure de zircon (APTES 0,03\_ZrOCl<sub>2</sub> 0,05) après une exposition à une atmosphère en équilibre avec une solution aqueuse de 2-NP 1 mmol/L (2 heures d'exposition à 37°C).**

### 3.4 Ajustement de l'indice de réfraction avec des alcoxydes

Dans un deuxième temps, le *n*-isopropoxyde de zirconium  $Zr(OPr)_4$  et le butoxyde de titane  $Ti(OBu)_4$  ont été utilisés comme précurseurs. La réactivité chimique des alcoxydes de métaux de transition est différente de celle des alcoxydes de silicium comme ceux utilisés précédemment, pour deux raisons :

- L'électronégativité plus faible des métaux de transition entraîne un caractère électrophile plus important. De ce fait, l'hydrolyse se fait plus facilement. En déterminant la distribution des charges partielles des atomes d'un alcoxyde, il est possible de prédire sa réactivité : plus le métal a une charge partielle positive élevée, plus il sera sensible à l'hydrolyse.
- Les métaux de transition présentent souvent plusieurs états de coordination stables, et ils sont capables d'étendre leur coordination via une addition nucléophile. Plus un métal dans un alcoxyde sera capable d'augmenter sa coordinence, plus il sera réactif. Cette capacité est définie comme le degré d'insaturation N-z, avec N la coordinence maximum et z le degré d'oxydation.

Alcoxyde	Zr(OEt) <sub>4</sub>	Ti(OEt) <sub>4</sub>	W(OEt) <sub>6</sub>	Si(OEt) <sub>4</sub>
$\chi(M)$	1,29	1,32	1,59	1,74
$\delta(M)$	+ 0,65	+ 0,63	+ 0,43	+ 0,32
N	7	6	8	4
N-z	3	2	2	0

**Tableau 5.4 : Les électronégativités  $\chi(M)$  et charges partielles  $\delta(M)$  définissent la sensibilité à l'hydrolyse. Le nombre de coordination maximum (N) et le degré d'oxydation (z) définissent la capacité à étendre la coordination des métaux dans différents alcoxydes. [13][14]**

Avec une faible électronégativité et une forte capacité des centres métalliques à augmenter leur coordination, **les alcoxydes utilisés (Zr(OPr)<sub>4</sub> et Ti(OBu)<sub>4</sub>) auront tendance à réagir très rapidement en présence d'eau et à former un précipité de manière non contrôlée.**



**Figure 5.12 : photographie d'un précipité formé lors de l'ajout d'eau à une solution de n-propoxyde de zirconium dans le méthanol.**

Il est possible de modifier chimiquement un alcoxyde pour diminuer sa réactivité. Soit en diminuant la charge partielle positive du métal, soit en augmentant sa coordination.

**Echange d'alcool** Il est possible d'échanger un ou plusieurs ligands par un autre alcool. C'est le cas notamment lorsqu'un alcoxyde est dissout dans un alcool autre que son alcool parent, du Si(OMe)<sub>4</sub> dans de l'éthanol par exemple. Il a été montré que la vitesse d'hydrolyse décroît lorsque la taille de la chaîne alkyle des ligands augmente, aussi bien pour les alcoxydes de silicium que pour les alcoxydes de titane. L'augmentation de la taille des substituants entraîne une diminution de la charge partielle positive sur les centres métalliques. Livage *et al.* relie cette diminution de la charge partielle à la diminution de la sensibilité à l'hydrolyse. [13]

Des diols comme l'éthylène glycol peuvent aussi être employés. Il ne s'agit plus dans ce cas d'un simple échange, ces composés sont capables d'agir comme des ligands bidentates grâce aux deux fonctions alcool. De même, les groupements polaires alcool et éther du 2-méthoxyéthanol peuvent tous les deux se lier au même cation. [15][16][17]

**Utilisation de ligands chélatants** Des ligands chélatants peuvent aussi être utilisés. C'est le cas de l'acide acétique (AcOH) ou de l'acétylacétone (acacH). L'acétate AcO<sup>-</sup> joue le rôle d'un ligand bidentate. [13][18] De même pour l'acétylacétone qui, sous sa forme énolique (acac), contient deux groupes hydroxyles qui réagissent avec les alcoxydes métallique. [19] La stœchiométrie du complexe obtenu dépend des ratios initiaux d'alcoxyde et de chélatant. Comme les groupes AcO<sup>-</sup> et acac partent plus difficilement, les précurseurs intermédiaires ont moins de groupes hydroxyles capables de condenser : la gélification est plus lente.

### 3.4.1 Avec acétylacétone

**Synthèse des xérogels** Des xérogels mixtes Si-Zr ont été synthétisés en utilisant l'acétylacétone comme chélatant du zirconium. Nous avons utilisé un alcoxyde commercial : l'acétylacétonate de zirconium ( $Zr(acac)_4$ ). Les ratios molaires TMOS/MeOH/APTES/H<sub>2</sub>O sont fixés à 1/5/0,3/4. Deux ratios de  $Zr(acac)_4$  ont été testés : 0,05 et 0,1 (Tableau 5.5).

Le  $Zr(acac)_4$  est introduit via une solution à 0,5 mol/L dans le méthanol anhydre. Les réactifs sont introduits dans l'ordre suivant : méthanol, TMOS, solution de  $Zr(acac)_4$ , APTES et eau. Les sols obtenus sont transparents et aucun précipité n'est observé. 1 mL de sol est versé dans des cuves en plastique de spectrophotométrie (EVERGREEN). Les cuves sont fermées hermétiquement en attendant la gélification pour éviter l'évaporation du solvant. Les deux sols gélifient après 12 heures puis les cuves sont fermées par un film adhésif poreux.

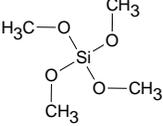
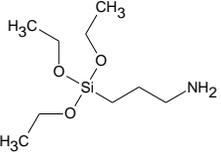
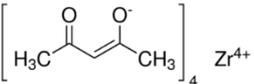
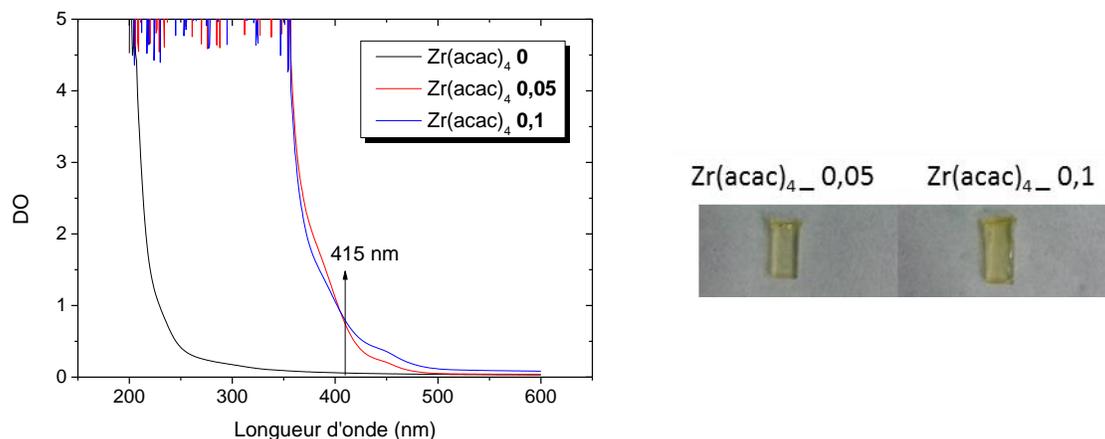
Formulation	6	7
<b>TMOS</b>  <b>CAS 681-84-5</b> <b>Sigma 341436</b>	0,95	0,9
<b>MeOH</b>	5	5
<b>APTES</b>  <b>CAS 919-30-2</b> <b>Sigma A3648</b>	0,03	0,03
<b>Zr(acac)<sub>4</sub> 0,5 mol/L dans MeOH</b>  <b>CAS 17501-44-9</b> <b>Sigma 338001</b>	0,05	0,1
<b>H<sub>2</sub>O</b>	4	4

Tableau 5.5 : Ratios molaires utilisés pour la synthèse de xérogels mixtes Si-Zr en utilisant l'acétylacétonate de zirconium comme source de zircone.

Les xérogels obtenus après séchage à 50°C sont jaunes et absorbent fortement aux longueurs d'ondes inférieures à 500 nm. A 415 nm, longueur d'onde d'intérêt pour la détection de 2-nitrophénolate, l'absorbance est proche de 1 (Figure 5.13).



**Figure 5.13 : Spectres d'absorption UV-visible et photographies des xérogels contenant de l'acétylacétate de zirconium**

**Indice de réfraction** L'ajout d'acétylacétate de zirconium permet bien d'augmenter l'indice de réfraction des xérogels, puisque l'indice augmente de 1,25 jusqu'à 1,45 lorsque le ratio de zircone est de 0,1 (Annexe 12.2).

**Porosité** Après un dégazage à 80°C pendant 48 heures, la porosité des matériaux obtenus a été caractérisée par adsorption-désorption d'azote. Les résultats sont présentés dans l'annexe 12.2. En présence de  $Zr(acac)_4$ , la surface développée et le volume poreux sont quasi-nuls.

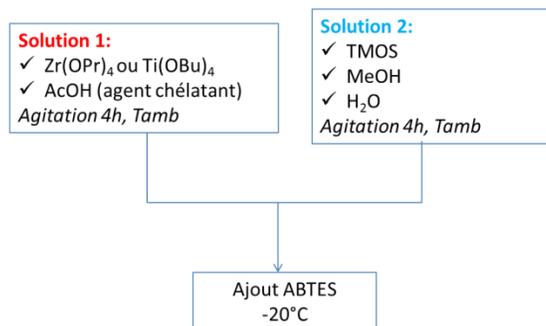
En utilisant l'acétylacétone comme agent chélatant, **l'alcoxyde correspondant, l'acétylacétate de zirconium, est bien moins réactif en présence d'eau que le propoxyde de zirconium**. Des gels transparents ont pu être obtenus avec un temps de gélification de 12 heures et un indice de réfraction satisfaisant pour former des rétroreflecteurs. Cependant, ces xérogels ne sont pas retenus comme capteurs du 2-nitrophénol pour deux raisons : leur absorbance élevée à 415 nm et leur faible porosité.

### 3.4.2 Avec acide acétique

Après l'acétylacétone, l'acide acétique a été utilisé comme agent chélatant. Cette fois-ci l'alcoxyde modifié  $Zr(OAc)_4$  n'est pas commercial. Il est généré par mélange d'un alcoxyde commercial, le n-propoxyde de zirconium  $Zr(OPr)_4$ , avec de l'acide acétique. Les essais ont également été conduits avec le titane, en partant du n-butoxyde de titane  $Ti(OBu)_4$ . Afin d'assurer l'homogénéisation de la silice et du métal de transition et éviter ainsi une séparation de phase, plusieurs auteurs conseillent de pré-hydrolyser le précurseur de silice afin de maximiser le nombre de groupements Si-OH avant de le mélanger avec un alcoxyde plus réactif. [20][21]

**Synthèse des xérogels** Les gels sont donc synthétisés de la manière suivante : l'alcoxyde de zirconium ou de titane est mélangé avec de l'acide acétique glacial, le tout sous atmosphère d'argon (Solution 1), et le tétraméthylorthosilicate TMOS est mélangé avec l'eau et le méthanol qui joue le rôle de co-solvant (Solution 2). Après quatre heures d'agitation à température ambiante, les deux solutions sont rassemblées. La solution obtenue est refroidie à -20°C avant l'ajout de l'ABTES (Figure 5.14). Après

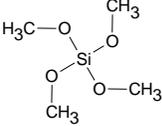
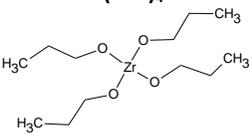
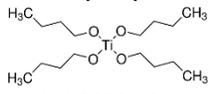
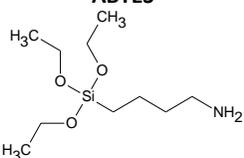
l'ajout d'ABTES, environ 2,5 mL de sol sont injectés dans un moule en PDMS. Les gels sont séchés à 50°C. Les xérogels obtenus ont les dimensions suivantes : 15 mm x 10 mm x 2 mm.



**Figure 5.14 : Protocole pour la préparation d'un gel mixte Si-Zr ou Si-Ti à partir d'alcoxydes de zirconium et titane stabilisés avec de l'acide acétique.**

Dans un premier temps, plusieurs ratios chélatant/métal (*i.e.* AcOH/Zr(OPr)<sub>4</sub>) ont été testés, ainsi que plusieurs ratios Zr/Si (*i.e.* Zr(OPr)<sub>4</sub>/TMOS) et Ti/Si (*i.e.* Ti(OBu)<sub>4</sub>/TMOS) (Tableau 5.6).

- Pour un ratio AcOH/Zr(OPr)<sub>4</sub> de 1,3 (formulation 8), un précipité se forme lorsque les solutions 1 et 2 sont mélangées, c'est-à-dire lorsque l'alcoxyde de zirconium entre en contact avec de l'eau. En augmentant la quantité d'acide acétique, on favorise la formation d'un alcoxyde modifié avec plus de ligands AcO<sup>-</sup>. Le ratio AcOH/Zr(OPr)<sub>4</sub> a donc été doublé (formulations 9, 10, 11 et 12). Pour ce ratio, **un alcoxyde de zirconium suffisamment chélaté a été formé ; son hydrolyse est suffisamment ralentie et il ne précipite pas lors du mélange des solutions 1 et 2.**
- Dans le cas du Ti(OBu)<sub>4</sub>, un ratio AcOH/Ti(OBu)<sub>4</sub> de 2 suffit à ralentir l'hydrolyse de l'alcoxyde.

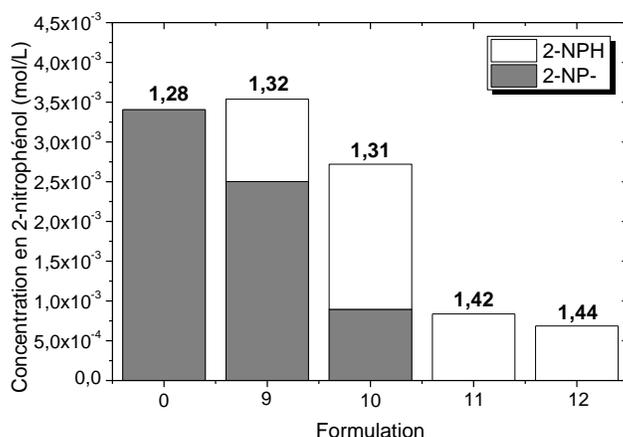
formulation	8	9	10	11	12	13	14
<b>AcOH/alcoxyde</b>	1,3	2,6	2,6	2,6	2,6	2	2
<b>TMOS</b>  <b>CAS 681-84-5</b> <b>Sigma 341436</b>	1	1	1	1	1	1	1
<b>Zr(OPr)<sub>4</sub></b>  <b>CAS 23519-77-9</b> <b>Sigma 333972</b>	0,042	0,02	0,042	0,07	0,14	/	/
<b>Ti(OBu)<sub>4</sub></b>  <b>CAS 3393-70-4</b> <b>Sigma 244112</b>	/	/	/	/	/	0,087	0,154
<b>AcOH glacial</b>	0,022	0,044	0,110	0,183	0,366	0,171	0,304
<b>ABTES</b>  <b>CAS 3069-30-5</b> <b>ABCR AB110803</b>	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
<b>MeOH</b>	10	10	10	10	10	10	10
<b>H<sub>2</sub>O</b>	4	4	4	4	4	4	4
<b>Temps de gélification</b>	/	5 min	~ 12 heures	~ 12 heures	~ 12 heures	5 min	5 min
<b>Aspect du gel</b>	Précipité	Transparent incolore					

**Tableau 5.6 : Ratios molaires utilisés pour la synthèse de xérogels mixtes Si-Zr et Si-Ti en utilisant le n-propoxyde de zirconium, le butoxyde de titane et l'acide acétique comme agent chélatant.**

**Porosité** Après un dégazage à 80°C pendant 48 heures, la porosité des matériaux contenant de la zircone a été caractérisée par adsorption-désorption d'azote. Les résultats sont présentés dans l'Annexe 12.3 La surface spécifique et le volume poreux diminuent lorsque la quantité d'alcoxyde de zircone est augmentée : de 612 m<sup>2</sup>/g à 311 m<sup>2</sup>/g pour la surface spécifique et de 0,395 cm<sup>3</sup>/g à 171 cm<sup>3</sup>/g pour le volume poreux lorsque le ratio de zircone passe de 0 à 0,14 (formulations 9 12). Néanmoins, ces valeurs restent acceptables dans le cadre de la capture d'un COV. Ces xérogels ont donc ensuite été exposés au 2-NP.

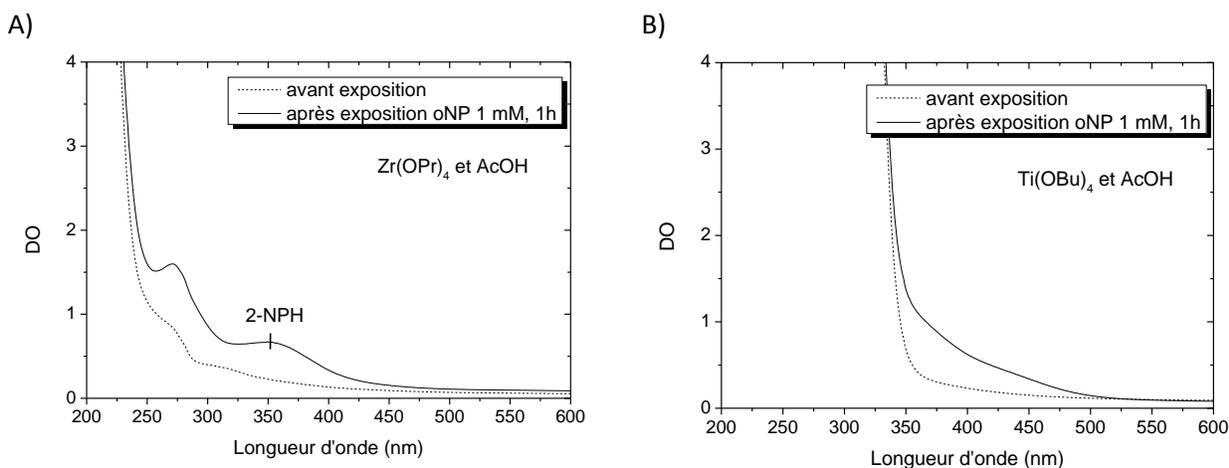
**Indice de réfraction et exposition au 2-NP** L'indice de réfraction des matériaux obtenus a été mesuré. A partir d'un ratio molaire de Zr(OPr)<sub>4</sub> de 0,07, l'indice de réfraction devient satisfaisant (1,42) (Figure 5.15). Puis, pour évaluer l'impact de la diminution de la porosité sur la capture des COV, les xérogels ont été mis en présence d'une atmosphère en équilibre avec une solution aqueuse de 2-nitrophénol selon le protocole décrit en Annexe 6.4 ([2-NP] = 1 mmol/L, pendant 1 heure à 37°C).

D'une part, la capture du 2-nitrophénol est impactée par la diminution de porosité (formulation 9 à 12). D'autre part, **les xérogels qui contiennent le plus d'alcoxyde de zirconium contiennent aussi de plus grandes quantités d'acide acétique** puisque le ratio  $\text{AcOH}/\text{Zr}(\text{OPr})_4$  est maintenu constant à 2,6. Dans les formulations 11 et 12 avec respectivement des ratios molaire de  $\text{Zr}(\text{OPr})_4$  de 0,07 et 0,14, la quantité d'acide est trop importante. Le porogène (ABTES) ne suffit plus à déprotonner le 2-NP qui se trouve alors entièrement sous sa forme acide moins aisée à détecter (absorbance maximale à 360 nm). Or ce sont ces xérogels qui ont un indice de réfraction satisfaisant, ( $n > 1,36$ ).



**Figure 5.15 : Quantités de 2-nitrophénol capturé par les xérogels contenant du  $\text{Zr}(\text{OPr})_4$  et de l'acide acétique lors d'une exposition à une atmosphère en équilibre avec une solution aqueuse de 2-NP 1 mmol/L (1 heure d'exposition à 37°C). La formulation 0 correspond aux xérogels  $\text{TMOS}/\text{MeOH}/\text{ABTES}/\text{H}_2\text{O} = 1/10/0,15/4$  séchés à 50°C sans zircone développés au chapitre 4.**

Les xérogels contenant du titane (formulations 13 et 14) ne seront pas retenus pour la suite de l'étude car ils absorbent fortement dans l'UV proche, ce qui empêche d'observer le pic d'absorption du 2-nitrophénol protonné à 360 nm (Figure 5.16.B).



**Figure 5.16 : Spectres UV-visible de xérogels avant et après exposition à une atmosphère en équilibre avec une solution aqueuse de 2-NP 1 mmol/L (1 heure d'exposition à 37°C), A) xérogel de formulation 11, B) xérogel de formulation 13.**

### 3.4.3 Avec acide acétique + une base

Pour contrebalancer le caractère acide des xérogels contenant de l'acide acétique, deux stratégies ont été utilisées :

- le ratio molaire du porogène ABTES a été augmenté (il comporte une fonction amine basique) ;
- une partie de l'acide acétique a été remplacée par un sel d'acétate.

**Synthèse des xérogels** Dans un premier temps, le ratio d'ABTES a été augmenté de 0,15 à 0,4 en laissant les autres paramètres fixés (formulations 15 à 18, Tableau 5.7). Le ratio de propoxyde de zirconium choisi est 0,07 car il permet d'obtenir un indice de réfraction satisfaisant. Les ratios molaires sont donc les suivants : TMOS /MeOH/H<sub>2</sub>O/Zr(OPr)<sub>4</sub>/AcOH = 1/10/4/0,07/0,183. Plus la quantité d'ABTES est importante, plus la gélification est rapide. Les gels obtenus sont incolores et transparents et sont séchés à 50°C dans des moules en PDMS.

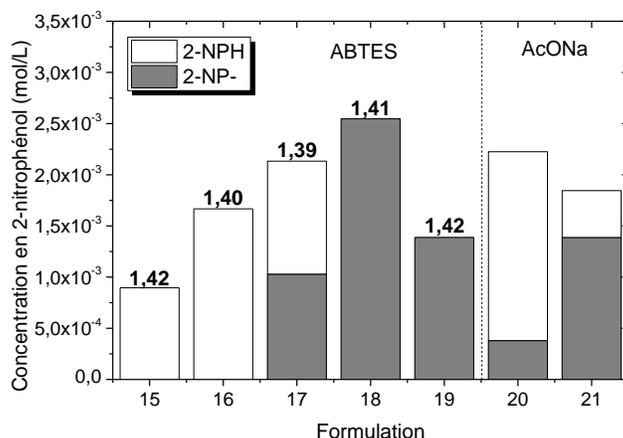
Dans un deuxième temps, une partie de l'acide acétique a été remplacée par de l'acétate de sodium (AcONa). Ce sel est directement dissout dans le mélange alcoxyde/acide acétique (formulations 19 et 20, Tableau 5.7).

formulation	15	16	17	18	19	20
ABTES	0,20	0,25	0,34	0,40	0,15	0,15
AcOH	0,183	0,183	0,183	0,183	0,135	0,092
AcONa	0	0	0	0	0,045	0,092
Temps de gélification	45 min	10 min	5 min	quelques secondes	45 min	45 min

Tableau 5.7 : ratio molaire d'ABTES utilisés dans des xérogels mixtes Si-Zr en utilisant le n-propoxyde de zirconium (ratio molaire 0,07) et l'acide acétique comme agent chélatant.

**Porosité** Après un dégazage à 80°C pendant 48 heures, la porosité des matériaux obtenus avec différents ratios molaires d'ABTES a été caractérisée par adsorption-désorption d'azote. En augmentant le ratio molaire d'ABTES, le diamètre des pores est augmenté (jusqu'à 60 Å), et la surface spécifique est diminuée (de 340 à 233 m<sup>2</sup>/g pour les formulations 15 à 18) (Annexe 12.3).

**Indice de réfraction et exposition au 2-NP** Ces xérogels ont été exposés à une atmosphère en équilibre avec une solution aqueuse de 2-nitrophénol selon le protocole décrit en Annexe 6.4 ([2-NP] = 1 mmol/L, pendant 1 heure à 37°C) et les indices de réfraction ont été mesurés (Figure 5.17). En augmentant le ratio d'ABTES (formulations 15→16→17→18), on augmente à la fois la quantité totale de 2-NP capturé, et la fraction de 2-NP déprotonné dans le xérogel. L'indice de réfraction est peu modifié par l'ajout d'ABTES.



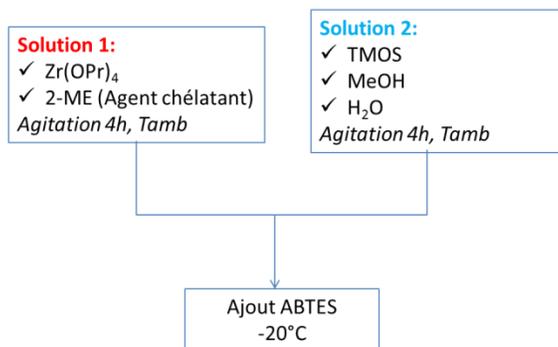
**Figure 5.17 :**Quantités de 2-nitrophénol capturé par les xérogels contenant du  $Zr(OPr)_4$  (ratio molaire 0,07) et différentes quantités d'ABTES et d'acétate de sodium lors d'une exposition à une atmosphère en équilibre avec une solution aqueuse de 2-NP 1 mmol/L (1 heure d'exposition à 37°C). Les indices de réfraction des matériaux sont donnés au-dessus des barres.

En conclusion, à partir d'un ratio de n-propoxyde de zirconium de 0,07, l'indice de réfraction obtenu est satisfaisant pour que le xérogel rétroreflecteur ait une acceptance angulaire intéressante. Cependant, nous avons constaté la présence d'acide acétique dans le xérogel final, ce qui empêche la déprotonation du 2-NP. Deux bases ont été ajoutées afin de compenser ce phénomène : de l'acétate de sodium (formulations 19 et 20) et de l'ABTES (formulations 15 à 18). **Nous retiendrons la formulation n°17, sans acétate mais avec un ratio d'ABTES de 0,34.** En effet, ces xérogels ont pu accumuler une concentration de  $2,56 \text{ mol/cm}^3$ , de 2-nitrophénolate, ce qui se rapproche des xérogels sans zircone développés au chapitre 4 ( $3,41 \text{ mol/cm}^3$ ).

### 3.4.4 Avec 2-méthoxyéthanol

Enfin, le 2-méthoxyéthanol (2-ME) a été essayé comme agent chélatant car les grosses quantités d'ABTES de la formulation 17 conduisent à une résistance mécanique insuffisante, comme nous le verrons plus tard dans ce paragraphe. Contrairement à l'acide acétique, le 2-ME ne va pas acidifier le sol ; on espère ainsi pouvoir limiter la quantité de silane aminé (ABTES) tout en déprotonnant le 2-nitrophénol dans le xérogel.

**Synthèse des xérogels** Le protocole suivi est le même qu'avec l'acide acétique : le n-propoxyde de zirconium est mélangé avec le 2-ME sous argon (Solution 1), et le tétraméthylorthosilicate TMOS est mélangé avec l'eau et le méthanol qui joue le rôle de co-solvant (Solution 2). Après quatre heures d'agitation à température ambiante, les deux solutions sont rassemblées. La solution obtenue est refroidie à  $-20^\circ\text{C}$  avant l'ajout de l'ABTES (Figure 5.18). Après l'ajout d'ABTES, environ 2,5 mL de sol sont injectés dans un moule en PDMS. Les gels sont séchés à  $50^\circ\text{C}$ .



**Figure 5.18 : Protocole pour la préparation d'un gel mixte Si-Zr à partir de n-propoxyde de zirconium stabilisé avec du 2-méthoxyéthanol.**

Dans un premier temps, nous avons cherché à savoir à partir de quel ratio chélatant/métal, *i.e.*

$R = \frac{n_{2-ME}}{n_{Zr(OPr)_4}}$ , l'échange d'alcool est suffisant pour obtenir un gel homogène. La somme des ratios

molaires de méthanol et 2-méthoxyéthanol est fixée à 10. Pour cette première étape, les ratios molaires de TMOS/Zr(OPr)<sub>4</sub>/ABTES/H<sub>2</sub>O sont fixés à 1/0,07/0,15/4 (formulations 21 à 25, Tableau 5.8). Puis, nous avons augmenté le ratio molaire de propoxyde de zirconium (formulations 26 à 29, Tableau 5.8).

Pour  $R = 7$  (formulation 21), un précipité se forme. En revanche, pour les valeurs de  $R$  supérieures ou égales à 14, un sol homogène et transparent est obtenu lors du mélange des solutions 1 et 2. **Un alcoxyde de zirconium suffisamment chélaté a été formé ; son hydrolyse est suffisamment ralentie et il ne précipite pas lors du mélange des solutions 1 et 2.**

La présence de 2-méthoxyéthanol a aussi une influence sur le séchage des gels puisque la température d'ébullition du 2-ME est de 125°C alors que celle du méthanol est de 65°C. Les gels qui contiennent un ratio important de 2-ME sèchent donc très lentement, même à 50°C.

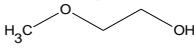
Formulation	21	22	23	24	25	26	27	28	29
$R = \frac{n_{2-ME}}{n_{Zr(OPr)_4}}$	7	14	28	71	142	14	71	142	14
<b>TMOS</b> CAS 681-84-5 Sigma 341436	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<b>Zr(OPr)<sub>4</sub></b> CAS 23519-77-9 Sigma 333972	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,14	0,14	0,14	0,20
<b>2-méthoxyéthanol</b>  CAS 109-86-4 Sigma 284467	0,5	1	2	5	10	1	5	10	1
<b>ABTES</b> CAS 3069-30-5 ABCR AB110803	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	
<b>MeOH</b>	9,5	9	8	5	0	9	5	0	9
<b>H<sub>2</sub>O</b>	4	4	4	4	4	4	4	4	4
<b>Temps de gélification</b>	/	3 min							
<b>Aspect du gel</b>	Précipité	transparent, incolore							
<b>Temps de séchage à 50°C</b>	/	7 jours	7 jours	12 jours	20 jours	7 jours	12 jours	20 jours	7 jours

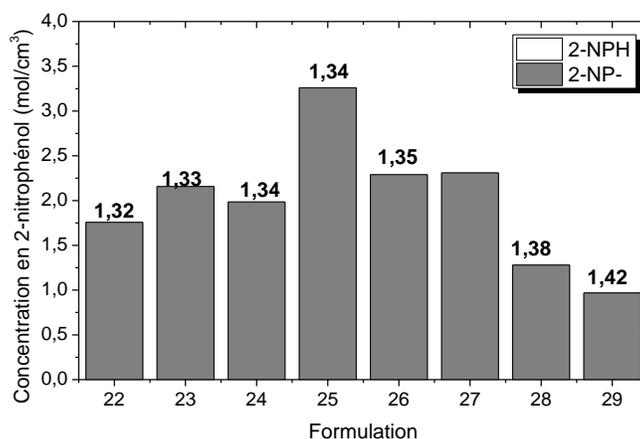
Tableau 5.8 : Ratios molaires utilisés dans des xérogels mixtes Si-Zr en utilisant le n-propoxyde de zirconium et le 2-ME comme agent chélatant.

**Porosité** Après un dégazage à 80°C pendant 48 heures, la porosité des matériaux obtenus avec différents ratios molaires d'ABTES a été caractérisée par adsorption-désorption d'azote (Annexe 12.4). Ces matériaux présentent une surface spécifique élevée (autour de 500 m<sup>2</sup>/g) et un volume poreux intéressant (entre 300 et 350 cm<sup>3</sup>/g). Pour comparaison, la formulation sans zirconium retenue au chapitre 4 présentait une surface spécifique de 612 m<sup>2</sup>/g et un volume poreux total de 0,395 cm<sup>3</sup>/g.

**Indice de réfraction et exposition au 2-NP** Ces xérogels ont été exposés à une atmosphère en équilibre avec une solution aqueuse de 2-nitrophénol selon le protocole décrit en Annexe 6.4 ([2-NP] = 1 mmol/L, pendant 1 heure à 37°C) et les indices de réfraction ont été mesurés (Figure 5.19).

L'avantage du 2-ME par rapport à l'acide acétique comme agent chélatant est l'absence de caractère acide qui gêne la déprotonation du 2-NP : avec le 2-ME, l'intégralité du 2-NP piégé se trouve sous forme phénolate absorbante à 415 nm. Malgré une très forte affinité pour le 2-nitrophénol, la formulation n°23 n'est pas retenue pour deux raisons : son indice de réfraction n'est pas suffisant et la grande quantité de 2-méthoxyéthanol entraîne un séchage long (~20 jours). Au cours de ce séchage long, le xérogel capte une grande quantité de composés siliconés volatils.

Les formulations 26 et 27 présentent une bonne affinité pour le 2-nitrophénol et un indice de réfraction proche de la consigne (1,36). Cependant, **la formulation 26 sera préférée : avec un ratio de 2-ME plus faible, le séchage des gels est plus rapide et la surface et le volume poreux développés sont plus élevés.**



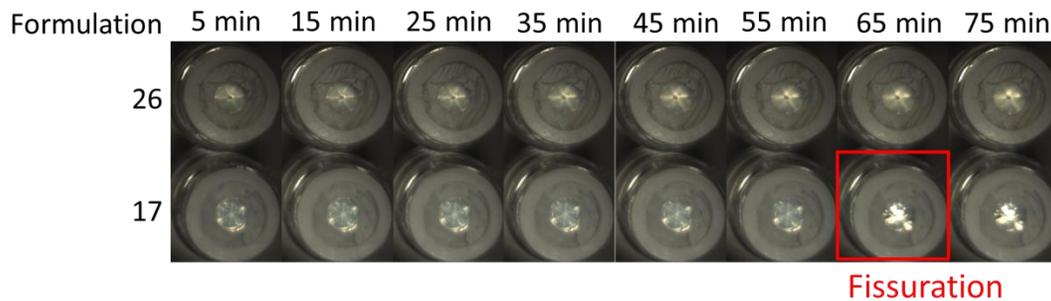
**Figure 5.19 : Quantités de 2-nitrophénol capturé par les xérogels contenant du Zr(OPr)<sub>4</sub> (ratio molaire 0,07 ou 0,14) chélaté par différentes quantités de 2-ME lors d'une exposition à une atmosphère en équilibre avec une solution aqueuse de 2-NP 1 mmol/L (1 heure d'exposition à 37°C). Les indices de réfraction des matériaux sont donnés au-dessus des barres.**

Le Tableau 5.9 récapitule les gels mixtes silice-zirconium synthétisés avec leurs propriétés en termes de porosité, indice de réfraction et capture et déprotonation du 2-NP. Lorsque ces critères sont satisfaisants, ils sont indiqués en vert ( $S_{\text{BET}} > 400 \text{ m}^2/\text{g}$ ,  $n > 1,36$  et 2-NP- piégé  $> 2 \text{ mmol/L}$ ) sinon, en rouge.

**Les formulations 17 et 26 sont celles qui satisfont le mieux ces critères.** La 17 en particulier a un indice de réfraction plus élevé (1,41) tout en capturant une plus grande quantité de 2-nitrophénolate.

Au cours des expositions à une atmosphère générée par une solution aqueuse de 2-nitrophénol, nous avons remarqué que les xérogels issus de la formulation 17 sont fragiles et ont tendance à se fissurer à cause de l'entrée d'eau dans les pores.

Une expérience simple a été réalisée pour comparer la résistance des 2 xérogels aux forces capillaires mises en jeu lorsque celui-ci se remplit d'eau. Des xérogels en forme de coin de cube de formulations 17 et 26 ont été placés dans le septum qui ferme un flacon de 20 mL contenant 15 mL d'eau. Une photo des rétro-rélecteurs est prise à intervalles réguliers. On remarque que le xérogel de la formulation n°17 se fissure après 65 minutes. Après fissuration, il n'est donc pas possible de suivre l'intensité lumineuse réfléchie. Cette fragilité est attribuée au fait que cette formulation contient une grande quantité d'ABTES. Le groupement aminobutyle de cet alcoxyde n'est pas hydrolysable et ne participe donc pas au réseau d'oxyde. Avec une grande quantité de groupements qui ne participent pas au réseau d'oxyde, le degré de réticulation est moins important, d'où une plus grande fragilité. La formulation 26 sera donc utilisée dans la suite de l'étude, à savoir des expositions à du 2-NP généré chimiquement et issu d'hydrolyse enzymatique dans des milieux simples puis complexes.



**Figure 5.20 : photographies de xérogels rétro-rélecteurs dans les septums qui bouchent des flacons contenant de l'eau. Après 65 minutes, le xérogel de formulation 17 se fissure sous l'effet des forces capillaires.**

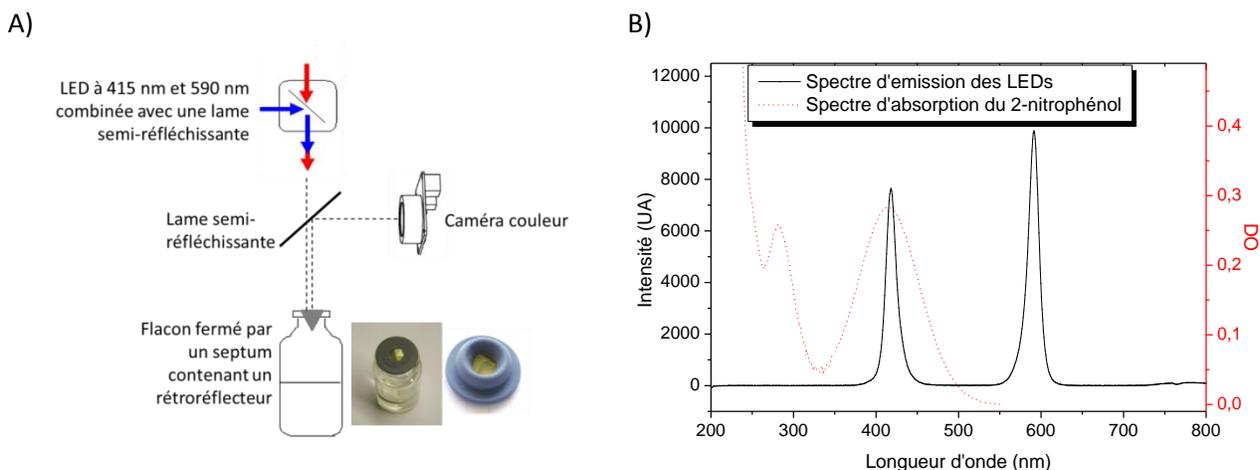
Formulation	Précurseur de zircon / ratio molaire	Chélatant / ratio $\frac{\text{chélatant}}{\text{Zr}}$	volume poreux (cm <sup>3</sup> /g) / S <sub>BET</sub> (m <sup>2</sup> /g)	Indice de réfraction	concentration de 2-NP <sup>-</sup> capturé (mmol/L)
1	ZrOCl <sub>2</sub> / 0,01	/	/	1,239	/
2	ZrOCl <sub>2</sub> / 0,05	/	0,049 / 116	1,433	0
3	ZrOCl <sub>2</sub> / 0,1	/	/	1,461	/
4	ZrOCl <sub>2</sub> / 0,15	/	0,05 / 119	1,491	0
5	ZrOCl <sub>2</sub> / 0,2	/	/	/	/
6	Zr(acac) <sub>4</sub> / 0,05	acac / 4	0,012 / 55	1,412	/
7	Zr(acac) <sub>4</sub> / 0,1	acac / 4	0,013 / 50	1,452	/
8	Zr(OPr) <sub>4</sub> / 0,042	AcOH / 1,3	/	/	/
9	Zr(OPr) <sub>4</sub> / 0,02	AcOH / 2,6	/	1,319	2,50
10	Zr(OPr) <sub>4</sub> / 0,042	AcOH / 2,6	0,363 / 523	1,313	0,90
11	Zr(OPr) <sub>4</sub> / 0,07	AcOH / 2,6	0,203 / 356	1,421	0
12	Zr(OPr) <sub>4</sub> / 0,14	AcOH / 2,6	0,171 / 311	1,435	0
15	Zr(OPr) <sub>4</sub> / 0,07	AcOH / 2,6	0,223 / 340	1,396	0
16	Zr(OPr) <sub>4</sub> / 0,07	AcOH / 2,6	0,223 / 313	1,386	1,03
<b>17</b>	<b>Zr(OPr)<sub>4</sub> / 0,07</b>	<b>AcOH / 2,6</b>	<b>0,160 / 233</b>	<b>1,410</b>	<b>2,55</b>
18	Zr(OPr) <sub>4</sub> / 0,07	AcOH / 2,6	/	1,420	1,39
19	Zr(OPr) <sub>4</sub> / 0,07	AcOH et AcONa / 2,6	/	/	0,38
20	Zr(OPr) <sub>4</sub> / 0,07	AcOH et AcONa / 2,6	/	/	1,39
21	Zr(OPr) <sub>4</sub> / 0,07	2-ME / 7	/	/	/
22	Zr(OPr) <sub>4</sub> / 0,07	2-ME / 14	0,309 / 432	1,324	1,76
23	Zr(OPr) <sub>4</sub> / 0,07	2-ME / 28	0,294 / 543	1,326	2,16
24	Zr(OPr) <sub>4</sub> / 0,07	2-ME / 71	0,325 / 532	1,338	1,98
25	Zr(OPr) <sub>4</sub> / 0,07	2-ME / 142	0,240 / 430	1,344	3,26
<b>26</b>	<b>Zr(OPr)<sub>4</sub> / 0,14</b>	<b>2-ME / 14</b>	<b>0,348 / 520</b>	<b>1,354</b>	<b>2,29</b>
27	Zr(OPr) <sub>4</sub> / 0,14	2-ME / 71	0,243/327	/	2,31
28	Zr(OPr) <sub>4</sub> / 0,14	2-ME / 142	/	1,380	1,28
29	Zr(OPr) <sub>4</sub> / 0,2	2-ME / 14	0,327 / 530	1,415	0,97

Tableau 5.9 : tableau récapitulatif des xérogels mixtes Si-Zr synthétisés. Le cahier des charges requiert une porosité élevée, un indice de réfraction d'au moins 1,36 et un pH intrapore supérieur à 7,2 afin de déprotonner le 2-nitrophénol.

## 4. Exposition des rétroreflecteurs à du 2-NP généré chimiquement

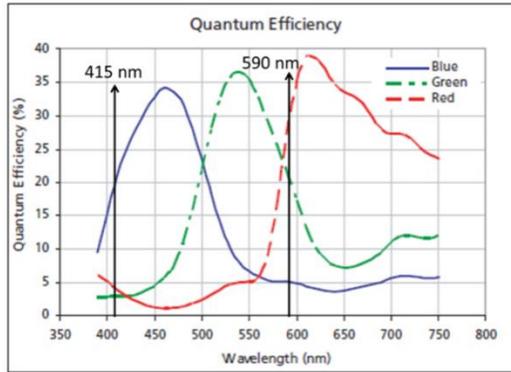
### 4.1 Montage expérimental

Dans un premier temps, les xérogels rétroreflecteurs de formulation 26 ont été exposés à une atmosphère générée par une solution aqueuse de 2-nitrophénol. Pour suivre l'adsorption du 2-nitrophénol dans les xérogels, un montage de lecture en réflexion a été mis en place (Figure 5.21). Deux LEDs éclairent le rétroreflecteur : une première à 420 nm (Mightex LCS-0420-02-22) qui permet de suivre l'absorption du nitrophénolate à 415 nm et une deuxième à 590 nm (Mightex LCS-0590-03-22) qui sert de référence. Les faisceaux des deux LEDs sont combinés à l'aide d'une lame semi-réfléchissante (Mightex LCS-BC25-0000). Une seconde lame semi-réfléchissante (Newport 10B20BS.1) envoie une partie de la lumière réfléchiée par le rétroreflecteur vers une caméra couleur (Mightex SCN-C030-U).



**Figure 5.21 : A) schéma du montage expérimental permettant le suivi de l'absorption des xérogels rétroreflecteurs à 415 nm. B) Spectres d'émission des LEDs utilisées et spectre d'absorption du 2-nitrophénol.**

Sur l'image obtenue, les canaux Rouge (R), Bleu (B) et Vert (V) sont séparés. La Figure 5.22 donne la sensibilité de la caméra aux différentes longueurs d'onde. A partir des valeurs de sensibilité des canaux R et B aux différentes longueurs d'onde, il est possible de remonter aux intensités lumineuses à 415 nm et 590 nm.



$$\begin{matrix} R \\ B \end{matrix} = \underbrace{\begin{pmatrix} S_R(415) & S_R(590) \\ S_B(415) & S_B(590) \end{pmatrix}}_S \times \begin{pmatrix} I(415) \\ I(590) \end{pmatrix}$$

Figure 5.22 : Sensibilité spectrale de la caméra couleur utilisée (Mightex SCN-C030-U).

Les coefficients de la matrice S de sensibilité sont donnés par la Figure 5.22 :  $S = \begin{pmatrix} 0,03 & 0,25 \\ 0,23 & 0,05 \end{pmatrix}$ .

Le déterminant de cette matrice vaut -0,056, elle est donc inversible.

On en déduit  $S^{-1} = \begin{pmatrix} -0,89 & 4,46 \\ 4,11 & -0,54 \end{pmatrix}$ , donc les intensités à 415 nm et 590 nm :

$$\begin{pmatrix} I(415) \\ I(590) \end{pmatrix} = S^{-1} \times \begin{pmatrix} R \\ B \end{pmatrix}.$$

## 4.2 Suivi de la capture de 2-nitrophénol

L'application visée pour nos capteurs est la détection de micro-organismes dans le sang (application hémocultures) et dans les matrices alimentaires. Dans ce type de milieux complexes, plusieurs paramètres physico-chimiques peuvent avoir une influence sur le transfert de masse liquide/gaz du 2-NP et donc sur la concentration en phase gazeuse. Dans un premier temps, les rétroreflecteurs sont testés vis-à-vis d'atmosphères de 2-nitrophénol générées chimiquement à partir de solutions aqueuses simples. puis, les atmosphères sont générées à partir d'une solution de sang de cheval.

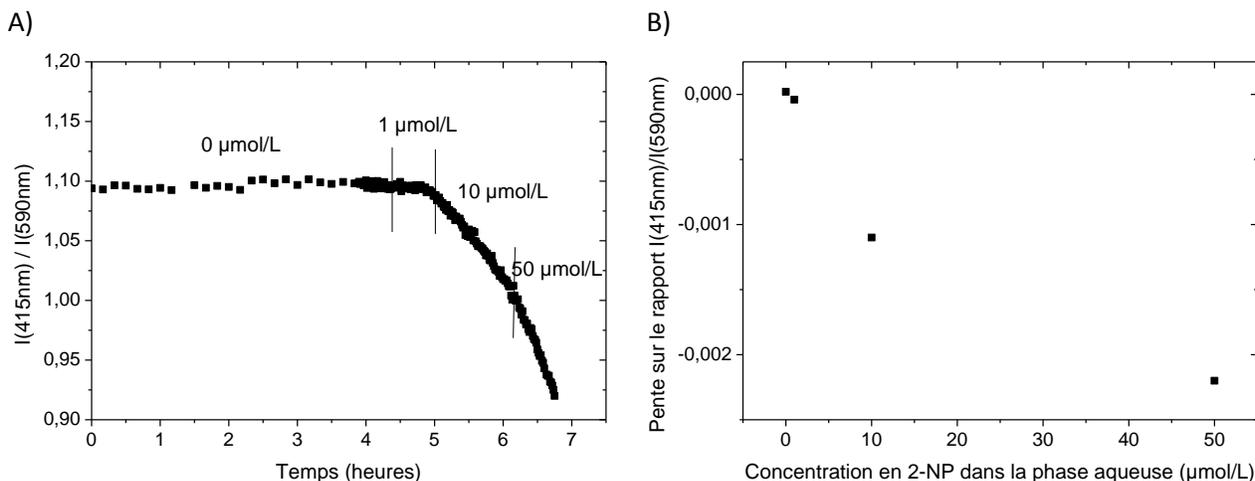
### 4.2.1 Suivi du piégeage de 2-nitrophénol issu d'une solution simple

Afin d'estimer la sensibilité d'un rétroreflecteur dans un tel montage, un rétroreflecteur de formulation 26 a été placé, la pointe vers le bas, dans le septum qui ferme un flacon de 20 mL contenant 15 mL d'eau tamponnée à pH = 6,1 avec du MES (Figure 5.23). Après une nuit, il est placé au-dessus de solutions tamponnées (MES, pH = 6,1) contenant différentes concentrations de 2-NP : 1 µmol/L, 10 µmol/L et 50 µmol/L. Des photographies sont prises toutes les minutes et sur chaque image les intensités I(415nm) et I(590nm) sont mesurées. Lorsque la concentration en 2-nitrophénol dans la phase aqueuse augmente, du 2-nitrophénolate s'accumule dans le rétroreflecteur qui se met à absorber la lumière à 415 nm. Pour chaque concentration en 2-nitrophénol, la dérivée moyenne du rapport I(415 nm)/I(590 nm) a été calculée (Figure 5.24.B). L'ajout de 1 µmol/L ne modifie pas de manière

significative l'absorbance du rétroreflécteur à 415 nm pour une durée d'exposition de 30 minutes environ. En revanche, une concentration de **10  $\mu\text{mol/L}$  de 2-nitrophénol dans la phase aqueuse entraîne une diminution importante de l'intensité lumineuse réfléchie à 415 nm**. Le temps de réponse est très rapide puisque la variation d'intensité à 415 nm est visible deux minutes à peine après le changement de solution (passage de 1 à 10  $\mu\text{mol/L}$  de 2-NP). D'après la loi de Henry, la concentration en 2-NP dans une atmosphère en équilibre avec une solution aqueuse à 10  $\mu\text{mol/L}$  est de 140 ppb. Comme pour le montage utilisant une superposition de parallélépipèdes (Chapitre 4), cette limite de détection reste meilleure que celle donnée en SPME-GC-MS (12  $\mu\text{mol/L}$ ) avec un temps d'accumulation plus court (deux minutes au lieu de 10). [22] Mais l'avantage majeur reste l'instrumentation bien plus simple et moins coûteuse qu'une GC-MS.



**Figure 5.23 : Photographie d'un flacon contenant une solution tamponnée de 2-NP fermé par un septum avec un xérogel rétroreflécteur et zoom sur le septum et le rétroreflécteur. La pointe du rétroreflécteur est dirigée vers la solution.**

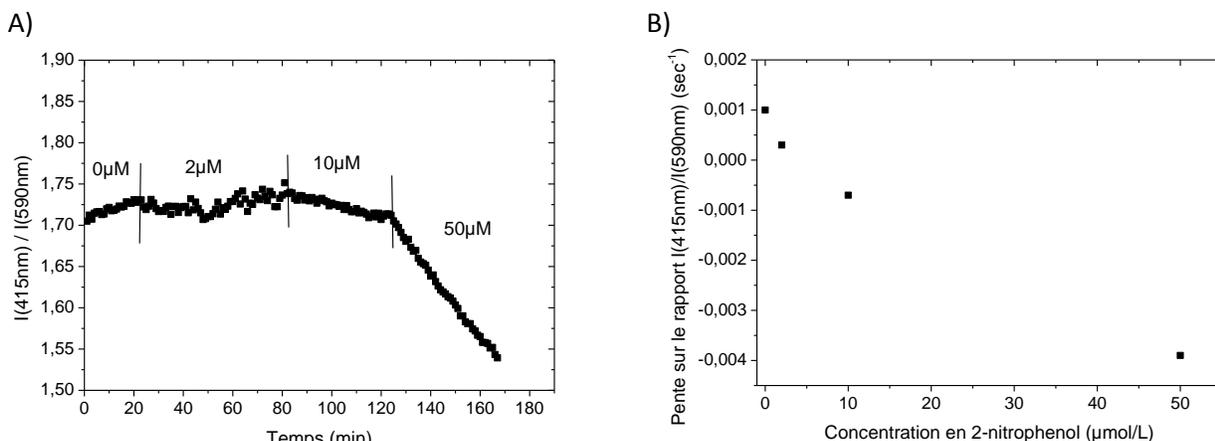


**Figure 5.24 : Suivi avec un rétroreflécteur poreux de la capture de 2-nitrophénol issu d'une solution aqueuse tamponnée A) Suivi au cours du temps du rapport des intensités à 415 nm et 590 nm. B) Dérivées moyennes du rapport  $I(415\text{nm})/I(590\text{nm})$ .**

#### **4.2.2 Suivi du piégeage de 2-nitrophénol issu d'une solution complexe : le sang de cheval**

La même expérience a été réalisée avec du 2-nitrophénol issu d'une solution de sang de cheval dans du sérum physiologique tamponné à  $\text{pH} = 6,1$  (MES). Le sang est un milieu très concentré en cellules, principalement des globules rouges avec une concentration de l'ordre de  $4-6 \cdot 10^9$  cellules/mL. Ces cellules sont des colloïdes à la surface desquels peuvent s'adsorber les molécules de 2-nitrophénol.

Les volumes utilisés sont les suivants : 12 mL de sérum physiologique pour 3 mL de sang. Un rétroreflécteur de formulation 26 a été placé dans le septum qui ferme le flacon. Après une nuit au-dessus d'eau tamponnée à pH = 6,1 avec du MES, il est placé au-dessus de mélanges sang de cheval/sérum physiologique contenant différentes concentrations de 2-NP : 2 µmol/L, 10 µmol/L et 50 µmol/L (Figure 5.25). Comme dans une solution simple, une concentration de 10 µmol/L de 2-nitrophénol dans la phase aqueuse entraîne une diminution importante de l'intensité lumineuse réfléchie à 415 nm, la limite de détection n'est donc pas affectée par la présence des cellules sanguines.



**Figure 5.25 : Suivi de la capture de 2-nitrophénol issu d'une solution de sang de cheval dans du sérum physiologique tamponné dans un rétroreflécteur poreux A) Suivi au cours du temps du rapport des intensités à 415 nm et 590 nm. B) Dérivées moyennes du rapport  $I(415\text{nm})/I(590\text{nm})$ .**



**Figure 5.26 : photographie d'un rétroreflécteur de formulation 26, avant (à gauche) et après (à droite) des expositions successives à des solutions de 2-NP dans le mélange sang de cheval/sérum physiologique tamponné.**

## 5. Suivi de la capture de 2-nitrophénol généré par la dégradation d'un substrat enzymatique.

Après avoir vérifié que nos rétroreflécteurs permettent de détecter le 2-nitrophénol en absorbance et en réflexion, nous les avons testés vis-à-vis de 2-NP issu de l'hydrolyse du substrat 2-nitrophényl-β-D-glucuronide par *E. coli* dans les conditions d'une hémoculture, à savoir un mélange sang de cheval/milieu nutritif : ¼.

Trois expériences ont été réalisées avec des rétroreflécteurs placés dans les septums qui ferment des flacons de 20 mL contenant 15 mL de culture : 12 mL de milieu de culture (La composition est détaillée en Annexe 7.4) et 3 mL de sang de cheval.

- Avec *E. coli* (ATCC 25922), charge bactérienne initiale 9,3 ufc/mL (soit 140 ufc initialement dans le flacon) et avec substrat 2-nitrophényl- $\beta$ -D-glucuronide (111  $\mu$ mol/L) et inducteurs (méthyl  $\beta$ -D-glucuronide à 239  $\mu$ mol/L et glucuronate de sodium à 464  $\mu$ mol/L).
- Sans *E. coli* mais avec substrat 2-nitrophényl- $\beta$ -D-glucuronide (111  $\mu$ mol/L) et inducteurs (méthyl  $\beta$ -D-glucuronide : 239  $\mu$ mol/L) et glucuronate de sodium : 464  $\mu$ mol/L 100  $\mu$ mol/L). Ce contrôle permettra d'évaluer le signal dû à la dégradation du substrat par les enzymes du sang de cheval.
- Avec *E. coli* (ATCC 11775), charge bactérienne initiale 8,5 ufc/mL (soit 128 ufc initialement dans le flacon) et sans substrat 2-nitrophényl- $\beta$ -D-glucuronide ni inducteurs, ce qui nous permettra de vérifier si d'autres COV absorbants dans la même gamme de longueurs d'onde que le 2-NP sont produit par *E. coli* et capturés dans le rétroreflécteur.

Un barreau aimanté stérile assure une agitation des cultures. Le dispositif est placé dans un incubateur à 37°C (Figure 5.27). Des photos du rétroreflécteur éclairé avec les LEDs à 415 nm et 590 nm sont prises à intervalles réguliers avec la caméra couleur.

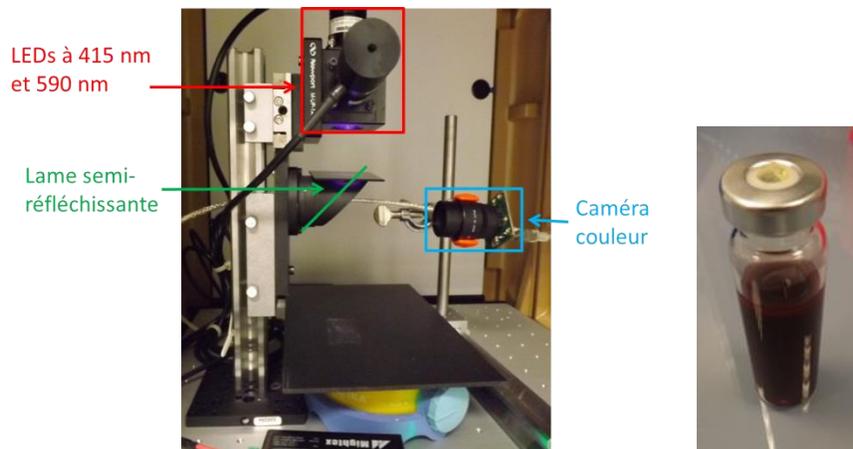


Figure 5.27 : photographies du montage expérimental placé dans un incubateur à 37°C et du flacon contenant une culture de *E. coli* dans un mélange sang de cheval/milieu nutritif avec un rétroreflécteur dans le bouchon

A partir des photos prises au cours de l'incubation, les intensités réfléchies par le rétroreflécteur à 415 nm et 590 nm sont suivies au cours du temps.

- Avec *E. coli* (ATCC 25922), charge bactérienne initiale 9,3 ufc/mL et substrat enzymatique (courbe bleue, Figure 5.28.A). Après 9 heures de culture, l'intensité à 415 nm chute brutalement à cause de l'adsorption et la déprotonation du 2-nitrophénol. Après une heure durant laquelle le 2-NP est piégé, l'intensité à 415 nm cesse de diminuer : il n'y a plus de 2-NP qui s'accumule. Les bactéries ont sûrement cessé de consommer le substrat enzymatique. En effet, il a été montré dans des conditions similaires qu'en une heure au cours de leur croissance exponentielle, les *E. coli* dégradent 80  $\mu$ mol/L sur les 113  $\mu$ mol/L de substrat enzymatique 4-nitrophényl- $\beta$ -D-glucuronide puis s'arrêtent de le dégrader. [23] La Figure 5.28.B montre des photographies du rétroreflécteur. Au début de l'expérience, le rétroreflécteur revoie de la

lumière jaune (590 nm) et bleue (415 nm). Après 12 heures, le rétroreflécteur absorbe la lumière à 415 nm et réfléchit toujours celle à 590 nm.

- **Sans *E. coli*, avec substrat enzymatique** (courbe rouge, Figure 5.28.A). L'intensité à 415 nm diminue lentement au cours du temps. En effet, le substrat est hydrolysé petit à petit par les enzymes du sang de cheval.
- **Avec *E. coli* (ATCC 11775), charge bactérienne initiale 8,5 ufc/mL, sans substrat enzymatique** (courbe noire, Figure 5.28.A). Le rapport des intensités reste quasi-constant : sans substrat 2-nitrophényl- $\beta$ -D-glucuronide, il n'y a pas de 2-NP produit. Aucun autre métabolite volatil absorbant à 415 ou 590 nm n'est piégé dans le rétroreflécteur. Il a été montré qu'une culture d'*E. coli* produit de l'indole à partir de tryptophane. Or, ce composé volatil absorbe dans une gamme de longueurs d'onde bien inférieure (< 300 nm) dans laquelle la caméra couleur n'est pas sensible. [22]

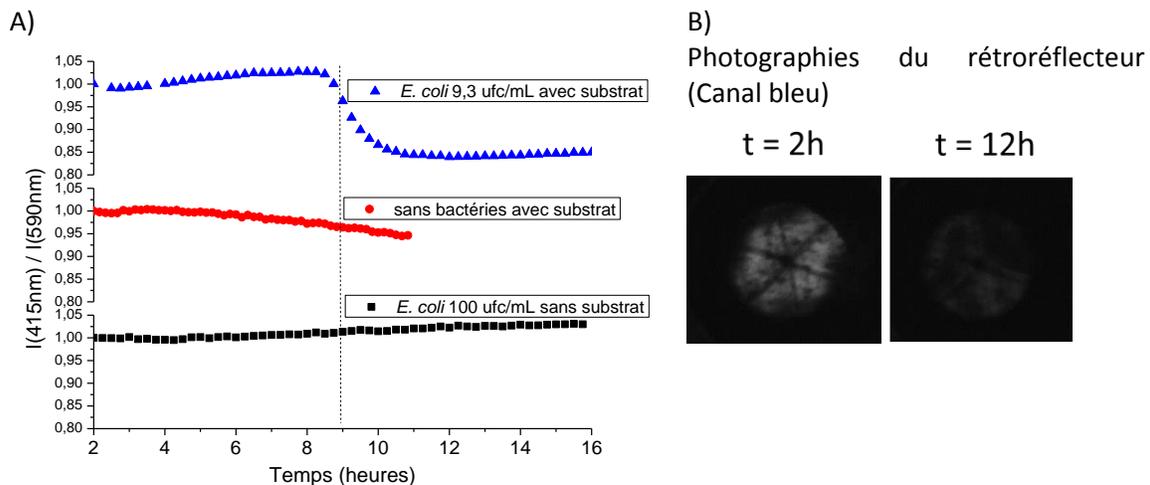


Figure 5.28 : A) Suivi au cours du temps du rapport des intensités à 415 nm et 590 nm réfléchies par les rétroreflécteurs placés au-dessus de différentes cultures. B) Photographies du rétroreflécteur (canal Bleu) exposé à la culture d'*E. coli* en présence de substrat enzymatique.

## Conclusion

Ce chapitre propose une mise en forme des xérogels innovante pour une détection des COV en réflexion. La forme de rétroreflécteur « coin de cube » a été retenue. Dans un premier temps, il a été nécessaire d'effectuer un nouveau travail de mise au point des xérogels puisqu'un critère supplémentaire s'est ajouté au cahier des charges : un indice de réfraction d'au moins 1,36. L'ajout de zircon dans le réseau d'oxyde a permis d'y répondre. Plusieurs stratégies ont été testées pour l'insertion de zircon : l'utilisation d'un sel inorganique ou d'un alcoxyde dont la réactivité est ajustée avec différents chélatants. Finalement, des xérogels répondant à tous les critères du cahier des charges ont pu être obtenus. Un moulage suivi d'un séchage dans un moule en polysiloxane perméable aux gaz permettent de donner aux gels la forme de coin de cube.

Cette géométrie présente l'avantage d'une instrumentation très simple et bas coût placée d'un seul et même côté du xérogel. Le fait de suivre l'absorbance sans ouvrir les flacons limite les risques de contaminations croisées et autorise des suivis en continu. En outre, étant donné l'acceptance angulaire des rétroreflecteurs obtenus, le faisceau lumineux qui sonde le matériau n'a besoin ni d'être collimaté, ni d'arriver avec une incidence normale par rapport à la surface. Des études sont en cours pour simplifier encore l'instrumentation, notamment en remplaçant la caméra couleur par une photodiode, moins coûteuse.

**On a ainsi pu assurer le suivi en continu de l'atmosphère d'un flacon d'hémoculture sans l'ouvrir.** Des concentrations jusqu'à 10  $\mu\text{mol/L}$  de 2-NP ont pu être détectées en phase gazeuse, ce qui reste avantageux comparé à la GC-SPME (12  $\mu\text{mol/L}$ ). Cette sensibilité a autorisé la détection d'une faible charge bactérienne d'*E. coli* (9,3 ufc/mL) dans le sang en moins de 9 heures. Ce système permet donc des temps de détection comparables à ceux des automates basés sur la détection du  $\text{CO}_2$  (BacT/ALERT et Bactec 460 : 300-3000 *E. coli*/mL en 9,5-10 heures). [24]

Le principe est transposable aux capteurs dopés avec une molécule sonde, en particulier aux capteurs de dérivés soufrés. De tels dispositifs pourront être utilisés pour instrumenter des bouchons afin de sonder l'intérieur d'un flacon ou d'un sac *Stomacher*, afin de suivre en continu la production de COV.

## Références bibliographiques

- [1] Centre National d'Etudes Spatiales, "1970 Première mesure précise de la distance Terre/Lune, <https://sciences-techniques.cnes.fr/fr/web/CNES-fr/9358-st-1970-premiere-mesure-de-la-distance-terrelune.php>." consulté le 20/07/2015.
- [2] T. Fatallah and G. Marchand, "Procédé de fabrication d'un objet à partir d'une solution sol-gel," WO 2013/045671 A1, 2012.
- [3] J. C. McDonald, D. C. Duffy, J. R. Anderson, D. T. Chiu, H. K. Wu, O. J. A. Schueller, and G. M. Whitesides, "Fabrication of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane)," *Electrophoresis*, vol. 21, no. 1, pp. 27–40, Jan. 2000.
- [4] C. Belon, A. Chemtob, C. Croutxe-Barghorn, S. Rigolet, M. Schmitt, S. Bistac, V. Le Houerou, and C. Gauthier, "Nanocomposite coatings via simultaneous organic-inorganic photo-induced polymerization: synthesis, structural investigation and mechanical characterization," *Polym. Int.*, vol. 59, no. 8, pp. 1175–1186, Aug. 2010.
- [5] "Le PDMS et la microfluidique, <http://www.elflow.com/microfluidic-tutorials>." consulté le 22/07/2015.
- [6] O. Denisse and C. Densmore, "Sylgard Cure Inhibition Characterization," Los Alamos National Laboratory, Report La-UR-12-25325, 2011.
- [7] J. C. McDonald and G. M. Whitesides, "Poly(dimethylsiloxane) as a Material for Fabricating Microfluidic Devices," *Acc. Chem. Res.*, vol. 35, no. 7, pp. 491–499, Jul. 2002.
- [8] "<http://www.fluigent.com/microfluidic-flow-control-system>." consulté le 17/07/2015.
- [9] O.-A. Denisse and C. Densmore, "Sylgard Cure Inhibition Characterization." Los Alamos National Laboratory.
- [10] F. Gubbels, "Controlled volatility conformal coatings: why and how to use them." Global SMT & packaging, Jul-2004.
- [11] R. D. Shannon, R. C. Shannon, O. Medenbach, and R. Fischer, "Refractive Index and Dispersion of Fluorides and Oxides," *J. Phys. Chem.*, vol. 31, no. 4, pp. 931–970, 2002.
- [12] B. Hua, G. Qian, M. Wang, and K. Hirao, "Refractive index adjustment of SiO<sub>2</sub> gel glass with zirconium oxychloride," *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, vol. 33, no. 2, pp. 169–173, 2005.
- [13] J. Livage, M. Henry, and C. Sanchez, "Sol-Gel Chemistry of Transition-Metal Oxides," *Prog. Solid State Chem.*, vol. 18, no. 4, pp. 259–341, 1988.
- [14] S. Norvez, "Cours de chimie douce, Polymérisation inorganique, synthèse d'oxydes." <https://cours.espci.fr/site.php?id=26&fileid=806>, 2010.
- [15] B. Lee and S. Komarneni, *Chemical Processing of Ceramics, Second Edition*. CRC Press, 2005.
- [16] L. Pardo and J. Ricote, *Multifunctional Polycrystalline Ferroelectric Materials: Processing and Properties*. Springer Science & Business Media, 2011.
- [17] M. Sedlar and M. Sayer, "Reactivity of titanium isopropoxide, zirconium propoxide and niobium ethoxide in the system of 2-methoxyethanol, 2, 4-pentanedione and water," *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, vol. 5, no. 1, pp. 27–40, 1995.
- [18] H. Hayashi, H. Suzuki, and S. Kaneko, "Effect of Chemical Modification on Hydrolysis and Condensation Reaction of Zirconium Alkoxide," *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, vol. 12, no. 2, pp. 87–94, Oct. 1998.
- [19] J. C. Debsikdar, "Transparent zirconia gel-monolith from zirconium alkoxide," *J. Non-Cryst. Solids*, vol. 86, no. 1–2, pp. 231–240, Sep. 1986.
- [20] D. M. Pickup, G. Mountjoy, G. W. Wallidge, R. J. Newport, and M. E. Smith, "Structure of (ZrO<sub>2</sub>)<sub>x</sub>(SiO<sub>2</sub>)<sub>1-x</sub> xerogels (x=0.1, 0.2, 0.3 and 0.4) from FTIR, 29Si and 17O MAS NMR and EXAFS," *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 1, no. 10, pp. 2527–2533, Jan. 1999.

- [21] M. Palladino, F. Pirini, M. Beghi, P. Chiurlo, G. Cogliati, and L. Costa, "Sol-gel formation of silica-zirconia glasses," *J. Non-Cryst. Solids*, vol. 147, pp. 335–339, 1992.
- [22] E. Tait, J. D. Perry, S. P. Stanforth, and J. R. Dean, "Bacteria detection based on the evolution of enzyme-generated volatile organic compounds: Determination of *Listeria monocytogenes* in milk samples," *Anal. Chim. Acta*, vol. 848, pp. 80–87, Oct. 2014.
- [23] L.-H. Guillemot, M. Vrignaud, P. R. Marcoux, C. Rivron, and T.-H. Tran-Thi, "Facile and fast detection of bacteria via the detection of exogenous volatile metabolites released by enzymatic hydrolysis," *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 15, no. 38, p. 15840, 2013.
- [24] T. C. Thorpe, M. L. Wilson, J. E. Turner, J. L. DiGiuseppi, M. Willert, S. Mirrett, and L. B. Reller, "BacT/Alert: an automated colorimetric microbial detection system.," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 28, no. 7, pp. 1608–1612, 1990.

## Conclusion générale

---

La microbiologie doit répondre à des enjeux de santé publique majeurs tels que le développement des résistances bactériennes ou l'apparition de nouveaux pathogènes. L'analyse de la fraction volatile du métabolome pour l'identification de pathogènes est particulièrement attractive car elle permet de s'affranchir de la complexité des échantillons et peut permettre une identification non invasive.

L'objectif de la thèse est la mise au point de capteurs nanoporeux à grande surface spécifique dont le rôle est de piéger, concentrer et détecter optiquement certains des métabolites volatils émis par les micro-organismes (ou Composés Organiques Volatils Microbiens, MCOV). Cette stratégie de détection des MCOV vise à déceler des pathogènes de manière non-invasive dans des échantillons complexes aussi bien en microbiologie clinique qu'industrielle. Les échantillons visés sont le sang, le plasma et les matrices alimentaires. Les propriétés optiques défavorables (absorbance et/ou fluorescence intrinsèques, caractère diffusant) de ces échantillons rendent compliquée une détection des pathogènes dans le milieu même. Deux types de MCOV ont été ciblés : des métabolites endogènes spécifiques d'espèces pathogènes d'intérêt et des métabolites exogènes issus de l'hydrolyse d'un substrat par une activité enzymatique spécifique.

Des capteurs de Composés Soufrés Volatils (CSV) dopés avec une molécule sonde ont été mis au point ; la détection du produit de réaction entre les CSV et la molécule sonde se fait en absorbance. La molécule sonde retenue est l'acide 5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoïque) (ou DTNB). En présence de thiols, thiosulfates et sulfures, le pont disulfure central de cette molécule est rompu. Le produit de la réaction, l'acide 2-nitro-5-thiobenzoïque (TNB), sous sa forme déprotonnée ( $\text{TNB}^{2-}$ ), absorbe à 412 nm. Ces capteurs peuvent détecter 5 ppm d' $\text{H}_2\text{S}$  et 100 ppm de  $\text{CH}_3\text{SH}$  en deux heures.

Les COV émis par les micro-organismes sont nombreux et de natures très différentes. Pour éviter de devoir chercher de multiples molécules sondes et développer de nouveaux capteurs pour chaque pathogène d'intérêt, nous nous sommes tournés vers la détection de MCOV exogènes. Un substrat enzymatique est introduit dans le milieu de culture ; après hydrolyse par une enzyme spécifique de la bactérie ciblée un composé volatil de notre choix (MVOC exogène) est libéré. Avec un même capteur il devient alors possible de détecter une grande variété d'espèces, en recourant à des substrats enzymatiques différents qui génèrent le même COV. Deux métabolites volatils ont été choisis : une amine aromatique, la  $\beta$ -naphthylamine ( $\beta$ -NA), pour les activités peptidases et un dérivé phénolique, le 2-nitrophénol (2-NP), pour les activités glycosidases et estérases.

La  $\beta$ -NA issue de l'activité L-alanine aminopeptidase peut faire l'objet d'un test pour déterminer précocément le caractère Gram. La  $\beta$ -NA peut être mise en évidence optiquement selon deux modes : en absorbance avec une molécule sonde, le diméthylaminocinnamaldéhyde (DMACA) et en fluorescence sans molécule sonde. La détection en absorbance s'est révélée difficile à mettre en œuvre, en particulier à cause des contraintes sur le pH optimal de la réaction sonde/cible. La mise en évidence de la  $\beta$ -naphthylamine en fluorescence ( $\lambda_{\text{ex}} = 335 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{ém}} = 410 \text{ nm}$ ) semble plus prometteuse. Des capteurs sous forme de films minces ont permis de détecter jusqu'à 10 ppm de  $\beta$ -naphthylamine en quatre heures.

Le 2-nitrophénol a été choisi pour la mise en évidence de deux activités glycosidases,  $\beta$ -glucuronidase et  $\alpha$ -glucosidase, spécifiques de *E. coli* et *S. aureus* respectivement. Une activité estérase ( $C_8$ -estérase) spécifique de *Salmonella* a également été mise en œuvre. Le 2-NP est intrinsèquement absorbant à 415 nm sous sa forme phénolate, ce qui permet de s'affranchir d'une réaction avec une molécule sonde. Les capteurs développés ont permis la détection de 2  $\mu$ mol/L de 2-nitrophénol en phase aqueuse en quelques minutes. Cette méthode permet donc une meilleure sensibilité que la micro-extraction sur phase solide couplée à la chromatographie en phase gazeuse (12  $\mu$ mol/L), avec une instrumentation plus simple d'emploi et bien moins coûteuse.

Dans l'objectif de détecter des pathogènes dans des échantillons complexes, les limites de détection ont été établies lorsque le 2-NP se trouve dans trois milieux complexes : du lait (émulsion directe, *i.e.* suspension de gouttelettes d'huile dans l'eau), du sang de cheval dilué par 5 dans un milieu de culture et du sang de cheval pur. La limite de détection est augmentée à 5  $\mu$ mol/L pour les deux premiers milieux et à 20  $\mu$ mol/L dans le sang de cheval pur qui est très concentré en cellules (plusieurs milliards de cellules sanguines par mL).

Une mise en forme innovante des xérogels pour une lecture des capteurs en réflexion a été envisagée. La forme de rétroreflecteur « coin de cube » (ou prisme trihédral) a été retenue. Avec cette géométrie, la source de lumière et le détecteur sont placés d'un seul et même côté du xérogel. Pour que le prisme joue bien son rôle de rétroreflecteur, le matériau dans lequel il est constitué doit avoir un indice de réfraction d'au moins 1,36. L'ajout de zircone dans le réseau d'oxyde a permis de répondre à ce critère tout en gardant une bonne transparence dans le visible et une porosité importante. Plusieurs stratégies ont été testées pour l'insertion de zircone. L'ajout de n-propoxyde de zircone chélaté avec du 2-méthoxyéthanol a été retenu.

Des premières preuves de concept ont été réalisées avec des bactéries non pathogènes. Ces premiers tests ont montré que les capteurs sont capables de fonctionner dans les conditions difficiles d'un test biologique : avec beaucoup d'humidité et en présence de nombreux autres métabolites volatils.

Par la suite, les capteurs ont été utilisés pour la mise en évidence de trois pathogènes : *Salmonella*, *S. aureus* et *E. coli* dans des matrices alimentaires et des hémocultures. Ces expériences ont permis d'identifier les difficultés spécifiques inhérentes à chacun de ces milieux.

Dans les matrices alimentaires, les difficultés peuvent être dues à la composition chimique de l'échantillon et/ou la présence d'une flore locale qui présente l'activité enzymatique ciblée. Néanmoins, dans la mayonnaise, une matrice sans flore locale, moins de 100 cfu/mL de salmonelles ont pu être détectées dès l'étape d'enrichissement non-sélectif (norme ISO 6579) grâce à la production de  $H_2S$ . Il en est de même pour *S. aureus* via son activité  $\alpha$ -glucosidase. L'étape d'enrichissement sélectif (24 h) pourrait par conséquent être supprimée pour les échantillons négatifs à l'issue de la première étape (la majorité des analyses). Une telle stratification autoriserait un avantageux gain de temps, de main d'œuvre et de consommables. En revanche, pour les matrices avec une flore locale, l'enrichissement sélectif a été testé pour enrichir la culture en pathogène cible par rapport à la flore locale.

Malheureusement, cette procédure n'est pas immédiate et la flore locale a le temps de produire des COV de manière sensible, entravant ainsi la détection du pathogène cible.

Le sang contient des enzymes, dont l'activité dépend de l'enzyme considérée. En particulier, dans le sang de cheval utilisé, l'activité  $\alpha$ -glucosidase est plus importante que  $\beta$ -glucuronidase. A cause de l'importante activité  $\alpha$ -glucosidase intrinsèque du sang, il n'a pas été possible de détecter *S. aureus* dans le sang de cheval. L'ajout d'un inhibiteur d' $\alpha$ -glucosidase comme l'acarbose semble une piste prometteuse. Une étude sera nécessaire pour optimiser la quantité d'acarbose à introduire pour inhiber les enzymes du sang sans inhiber celles des *S. aureus*. L'activité  $\beta$ -glucuronidase du sang de cheval est bien moindre ; il a été ainsi possible de détecter *E. coli* jusqu'à 0,5 cfu/mL en 11 heures ; les automates d'hémocultures (Bactec 460, Bact/ALERT) utilisés en milieu hospitalier peuvent détecter 300-3000 cfu/mL en 9,5 à 10 h.

Les travaux réalisés ont permis de mettre au point des capteurs pour les composés soufrés volatils et d'illustrer le concept de détection de COV issu de l'hydrolyse spécifique de substrats osmogènes. La mise en forme avec une géométrie de rétrorélecteur pourra être adaptée aux capteurs dopés DTNB pour la détection des CSV. La détection des MCOV en fluorescence est prometteuse car elle pourrait mener à des limites de détection plus basses avec une spécificité accrue (à la fois sur les longueurs d'onde d'excitation et d'émission), à condition de mettre en œuvre des fluorophores qui soient suffisamment volatils. Pour cibler des activités glycosidases et estérases, le 2-naphthol peut être utilisé comme COV exogène fluorescent ( $\lambda_{ex} = 320$  nm,  $\lambda_{em} = 410$  nm,  $H_{cc} = 2 \cdot 10^{-6}$ ). Un travail sur la composition du matériau est encore nécessaire afin d'obtenir des films homogènes. Un dispositif de lecture plus simple qu'un spectrofluorimètre reste également à mettre au point. Une LED à 335 nm et une caméra couleur ou une photodiode pourraient être utilisées.

# Annexes

---

# Annexe 1 : Eléments de microbiologie

## 1.1-Taxonomie

La taxonomie est la science qui a pour objectif de décrire et de classer les organismes vivants. Le domaine des bactéries est divisé en plusieurs groupes qui rassemblent les individus présentant des caractères communs (caractéristiques morphologiques, métaboliques, physiologiques, etc.). Ces groupes forment un système hiérarchique dont le plus petit échelon est l'espèce. Au sein d'une espèce, on distingue plusieurs souches qui présentent des petites variations de caractères.

Nous avons utilisé des souches appartenant à deux *phyla* : des *Proteobacteria* et des *Firmicutes*. L'ensemble de ces souches est détaillé dans les Figure A.1 et Figure A.2. Elles portent un nom ATCC (American Type Culture Collection) ou NTCC (National Collection of Type Cultures). L'ATCC est une société privée américaine qui possède une grande diversité de ressources biologiques de référence (champignons, levures, bactéries et virus). La NCTC est une organisation publique anglaise, qui possède une collection de plus de 5000 souches de bactéries de référence.

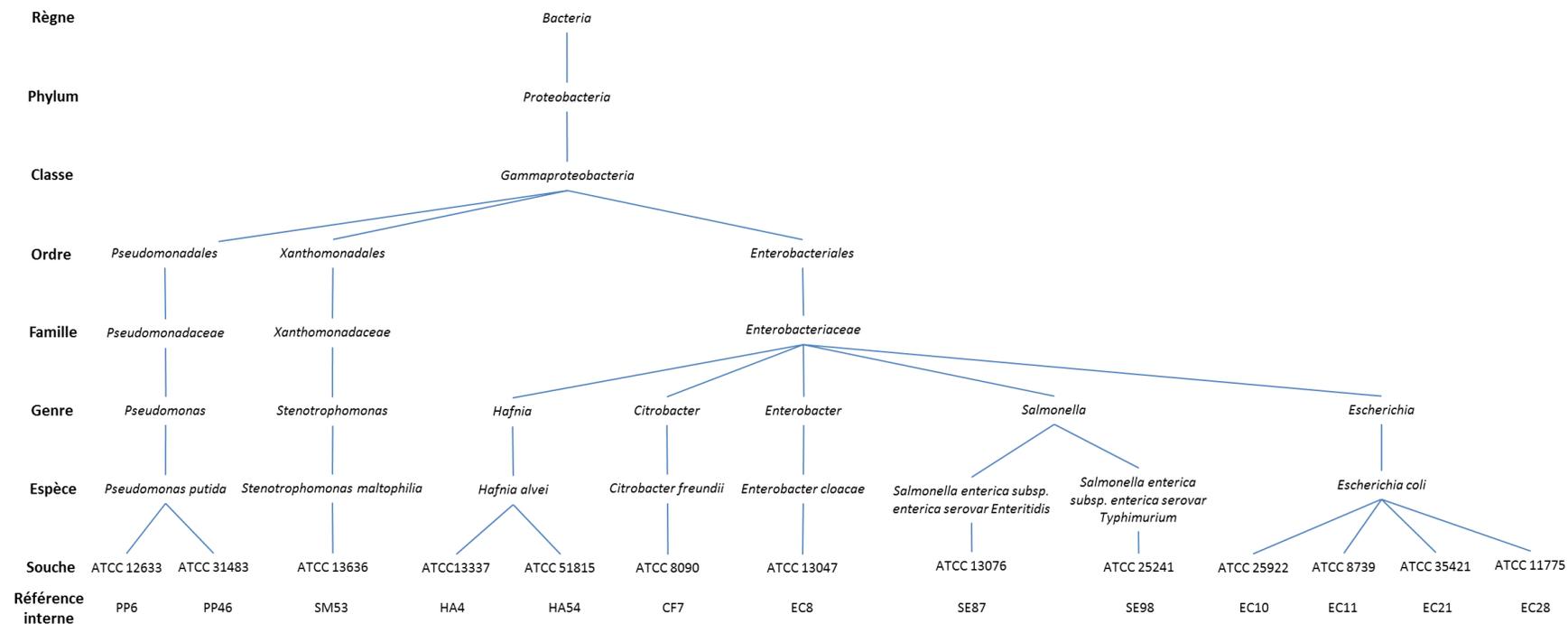


Figure A.1 : Taxonomie des différentes bactéries Gram - utilisées.

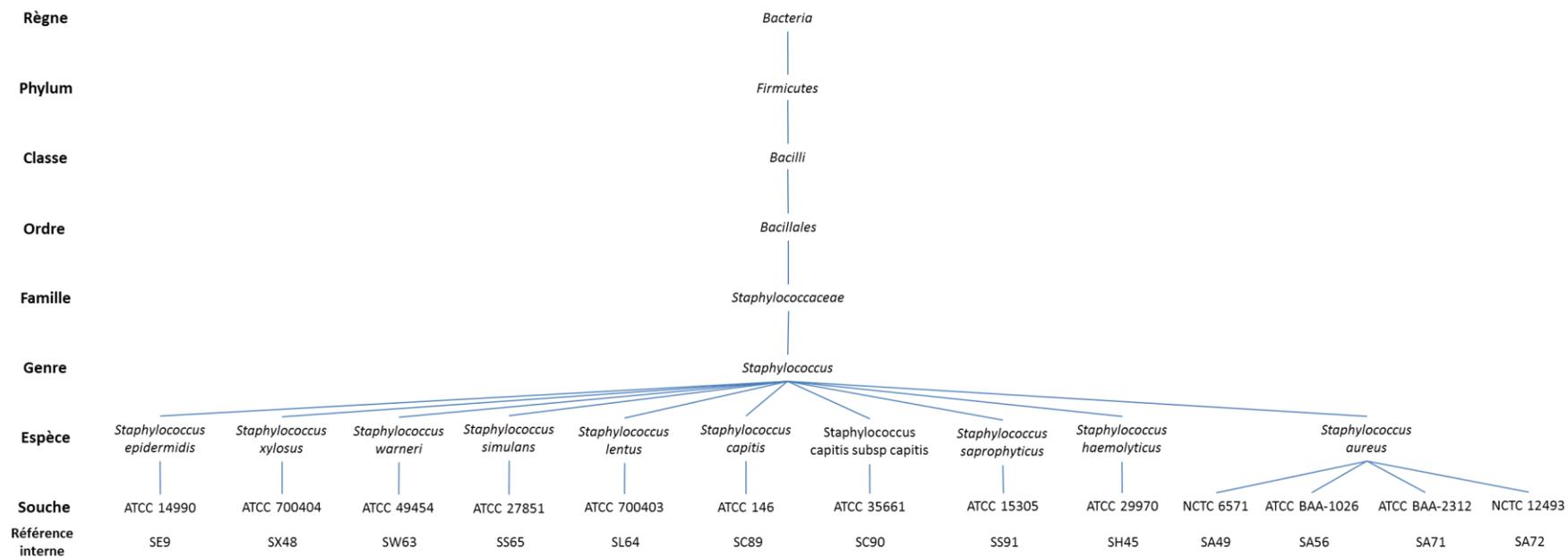


Figure A.2 : Taxonomie des différents Staphylocoques utilisés.

## 1.2-Croissance bactérienne

Dans un milieu de culture liquide ou gélosé contenant des nutriments, les bactéries sont capables de se multiplier par division cellulaire. La concentration en cellules dans le milieu augmente ; elle est donnée en cfu/mL (*colony forming unit*), ufc/mL (« unité formant colonie ») en français. Il s'agit du nombre de cellules viables pouvant former une colonie sur un milieu gélosé.

Lorsqu'une bactérie est ensemencée sur un nouveau milieu de culture, elle passe par une première **phase de latence (1)** où il n'y a pas de division cellulaire. Il s'agit de la période pendant laquelle la bactérie synthétise les enzymes qui lui seront nécessaires pour métaboliser les nutriments du milieu et répare les dommages subis par un éventuel stress extérieur (température, pH, osmolarité, etc.). Cette phase est suivie par une **phase de croissance exponentielle (2)** au cours de laquelle la vitesse de croissance est maximale et constante. Le temps de génération est défini comme le temps nécessaire pour doubler la population : il est constant lors de toute la durée de la phase exponentielle. Lorsque les ressources en nutriments du milieu s'épuisent et que les déchets métaboliques s'accumulent, les bactéries entrent dans une **phase de ralentissement (3)** et se divisent plus lentement. Elle est suivie d'une **phase stationnaire (4)** où les bactéries ne se divisent plus, la concentration en cellules reste constante. Puis, au fur et à mesure que les ressources s'épuisent, le taux de mortalité augmente et la concentration en cellules viables diminue : c'est la **phase de décroissance (5)**.

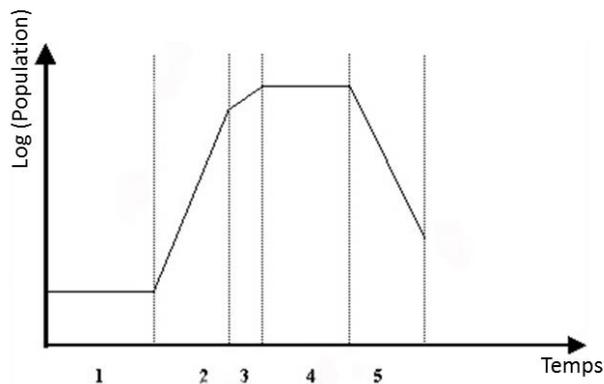
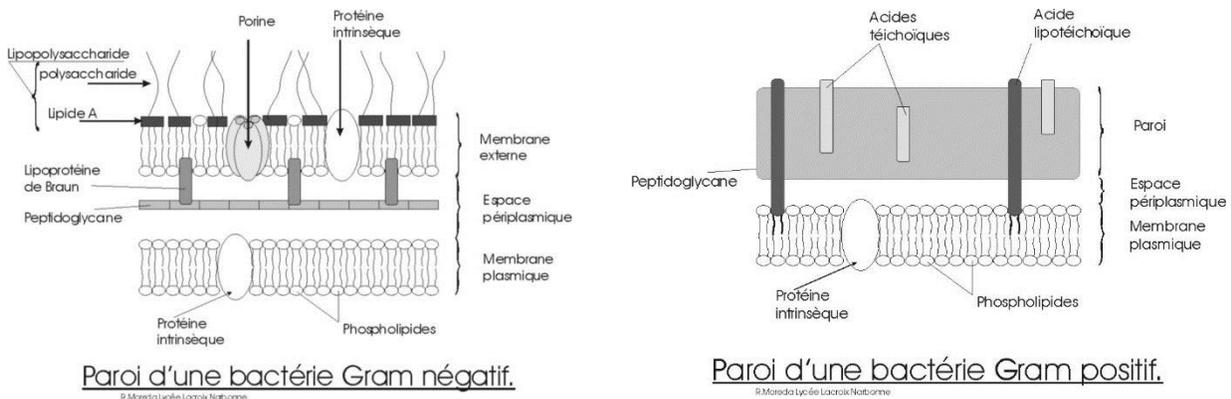


Figure A.3 : Les cinq phases de la croissance bactérienne. [1]

### 1.3-Distinction Gram+/Gram-

La coloration de Gram revêt une grande importance en microbiologie. Mise au point en 1884 par Hans Christian Gram, elle a été un des premiers critères de classement des procaryotes. Il s'agit de les classer en deux groupes en fonction de la structure de leur paroi cellulaire. C'est un des premiers tests réalisés sur une souche à identifier (test d'orientation).

- Les Gram+ regroupent par exemple les genres tels que *Bacillus*, *Listeria*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, etc. La paroi des Gram+ est composée d'une simple membrane plasmique recouverte d'une épaisse couche de peptidoglycane
- Parmi les Gram-, on trouve : *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Legionella*, *Helicobacter*, etc. La paroi des Gram- est composée d'une membrane plasmique et d'une membrane externe. Entre ces deux membranes s'insère une fine couche de peptidoglycane.



**Figure A.4 : Différences de structure entre les parois des bactéries Gram+ et Gram-.**

La coloration de Gram permet de colorer les cellules de couleurs différentes en fonction des propriétés de leur paroi. Ce protocole s'effectue en quatre étapes :

- Les cellules sont d'abord colorées avec du violet de gentiane. Ce colorant se fixe sur les composants du cytoplasme quel que soit le type de paroi ; ainsi, toutes les cellules se colorent en violet. Une solution Lugol (diode et iodure de potassium) est étalée sur les cellules afin de fixer la couleur.
- La deuxième étape est délicate car il s'agit d'une décoloration sélective, réalisée par rinçage avec de l'éthanol à 95% ou un mélange éthanol-acétone. La paroi des Gram+, riche en peptidoglycane, ne laisse pas passer l'alcool : ces cellules ne sont pas décolorées. Au contraire, les bactéries à Gram- sont décolorées car leur paroi laisse passer l'alcool qui élimine le violet de gentiane.
- Sans coloration, il est très difficile d'observer les cellules au microscope optique, la dernière étape est une contre-coloration à la safranine ou à la fuchsine, suivie d'un rinçage. Cette étape permet de recolorer les cellules en rouge. La teinte violette des cellules à Gram+ n'est pas affectée par la couleur rouge de la fuchsine. En conséquence les Gram- apparaissent rose clair (après rinçage) alors que les Gram+ déjà colorées sont violettes.

On obtient ainsi une lame dont l'observation permettra de dire si nous sommes en présence de coques à Gram+ (e.g. *Staphylococcus*, *Streptococcus*), de coques à Gram+ (e.g. *Bacillus*, *Listeria*, *Clostridium*), de coques à Gram- (e.g. *Neisseria*) ou encore de bacilles à Gram- (e.g. *Enterobacter*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Vibrio*).

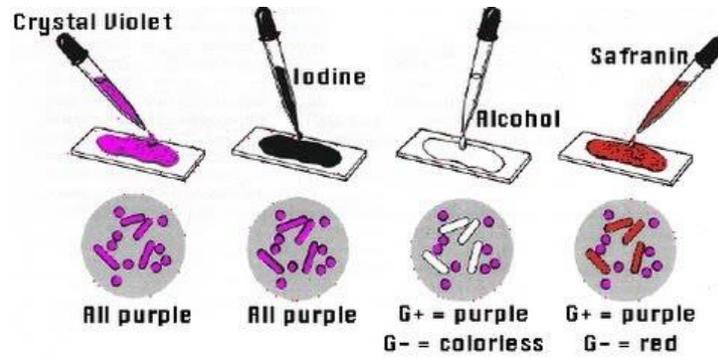


Figure A.5 : Protocole de la coloration de Gram.

## Annexe 2 : Définitions d'un composé organique volatil et de la constante de Henry

La directive européenne n° 1999/13/CE du conseil du 11 mars 1999 définit par le terme de Composé Organique Volatil (COV) « tout composé organique ayant une pression de vapeur de 0,01 kPa ou plus à une température de 293,15 K ou ayant une volatilité correspondante dans les conditions d'utilisation particulières».

Pour un composé hydrosoluble et volatil, la loi de Henry régit la répartition du COV entre la phase liquide et la phase gaz. Elle prend en compte à la fois la volatilité du composé (donné par sa pression de vapeur saturante) et sa solubilité dans l'eau.

Soient  $C_{i,aq}$  (en  $g/m^3$  ou en  $mol/m^3$ ) la concentration du composé volatil  $i$  dans la phase aqueuse et  $C_{i,gaz}$ , sa concentration dans la phase gazeuse (dans la même unité :  $g/m^3$  ou  $mol/m^3$ ), alors le coefficient de partition à l'équilibre (constante de Henry) est la grandeur sans dimension suivante:

$$H_{cc} = \frac{C_{i,gaz}}{C_{i,aq}}$$

Pour un composé volatil donné, à une température et une pression données, on retrouve, à l'équilibre, toujours le même coefficient de partition entre les deux phases. Des COV à forte constante présentent des valeurs supérieures à  $5 \cdot 10^{-2}$ . C'est le cas par exemple du benzène ( $H_{cc} = 0,191$ ) ou du n-pentane ( $H_{cc} = 68,2$ ). Des valeurs moyennes se situent autour de  $5 \cdot 10^{-4}$  à  $5 \cdot 10^{-2}$  (2-nitrophenol :  $H_{cc} = 5,85 \cdot 10^{-4}$ ; acétate d'éthyle :  $H_{cc} = 5,07 \cdot 10^{-3}$ ) et les valeurs faibles autour de  $10^{-5}$  (formaldéhyde :  $H_{cc} = 5,85 \cdot 10^{-6}$ ; phénol :  $H_{cc} = 2,84 \cdot 10^{-5}$ ; aniline :  $H_{cc} = 8,73 \cdot 10^{-5}$ ). Certains paramètres tels que la salinité, la température, le pH peuvent influencer la valeur de la constante de Henry.

Il existe de nombreuses manières d'exprimer cette même loi, suivant la définition que l'on donne de la constante de Henry et les unités utilisées (Tableau A.1)

$H_{CC}$ (sans dimension) $H_{CC} = \frac{C_{i,G}}{C_{i,L}}$	$C_{i,G}$ : concentration en composé i dans $\varphi_G$ (mol/L) $C_{i,L}$ : concentration en composé i dans $\varphi_L$ (mol/L)	Conversion $H_{CC} = \frac{1}{H^{cp} \cdot RT}$ $H_{CC} = \frac{12,2}{298,15 \cdot \frac{55,3}{K_{H,x}}}$
$H_{cp}$ ( $\frac{mol}{m^3 \cdot Pa}$ ) $H^{cp} = \frac{C_{i,L}}{P_{i,G}}$	$C_{i,L}$ : concentration en composé i dans $\varphi_L$ (mol/m <sup>3</sup> ) $P_{i,G}$ : pression partielle en composé i dans $\varphi_G$ (Pa)	Conversion $H^{cp} = \frac{1}{H^{cc} \cdot RT}$
$K_{H,x}$ (atm/fraction molaire) $K_{H,x} = \frac{P_{i,G}}{x_{i,L}}$ S'écrit aussi : $P_{i,G} = K_{H,x} \frac{(1-x_i)n_i}{n_e}$	$P_{i,G}$ : pression partielle en composé i dans $\varphi_G$ (atm) $x_{i,L}$ : fraction molaire du composé i dans $\varphi_L$ (sans dimension) $x_i$ : fraction molaire du composé i dans $\varphi_G$ (sans dimension) $n_i$ : nombre total de mol de composé i ( $\varphi_G + \varphi_L$ ) (en mol) $n_e$ : nombre total de mol d'eau dans la solution aqueuse (en mol)	Conversion $K_{H,x} = \frac{55,3 \cdot 298,15}{12,2} \cdot H_{CC}$ $K_{H,x} = \frac{55,3}{K_H}$

Tableau A.1: Description des constantes de Henry utilisées dans la littérature.

Nom du composé	Structure du composé	Constante de Henry $H_{CC}$	Références
Dioxyde de carbone	CO <sup>2</sup>		
Méthanethiol	CH <sub>4</sub> S	1,23.10 <sup>-1</sup> 1,05.10 <sup>-1</sup>	[2] [3]
Sulfure d'hydrogène	H <sub>2</sub> S	4,09.10 <sup>-1</sup>	[3]
4-nitrophénol	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>3</sub>	1,57.10 <sup>-8</sup>	[3]
		4,13.10 <sup>-5</sup>	[3]
		1,36.10 <sup>-6</sup>	[3]
		5,11.10 <sup>-7</sup>	[3]
2-nitrophénol	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>3</sub>	5,85.10 <sup>-4</sup>	[3]
		5,53.10 <sup>-4</sup>	[3]
		5,18.10 <sup>-4</sup>	[3]
β-naphthylamine	C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> N	3,3.10 <sup>-6</sup>	[4]
		3,36.10 <sup>-6</sup>	[3]
		5,04.10 <sup>-6</sup>	[3]
		8,8.10 <sup>-7</sup>	[3]
Indole	C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> N	1,52.10 <sup>-1</sup>	[5]
		2,16.10 <sup>-5</sup>	[4]
Formaldéhyde	CH <sub>2</sub> O	8,61.10 <sup>-6</sup>	[2]
		1,36.10 <sup>-5</sup>	[3]
		5,85.10 <sup>-6</sup>	[3]

Tableau A.2 : Quelques constantes de Henry de composés volatils d'intérêt

## Annexe 3 : Protocole de synthèse des xérogels

### 3.1-Xérogels dopés DTNB pour la détection des CSV

Le rapport molaire choisi entre le tétraméthylorthosilicate (TMOS, CAS 681-84-5, Sigma Aldrich 87682), le méthanol (MeOH, Sigma Aldrich 322415), le 3-aminopropyltriéthoxysilane (APTES, CAS 919-30-2, Sigma Aldrich A3648) et l'eau MilliQ est le suivant : TMOS/MeOH/APTES/eau = 1/5/0,03/4. La molécule sonde (le DTNB, CAS 69-78-3, Sigma Aldrich D8130) étant soluble dans le méthanol, elle est incorporée via la phase alcoolique. Plusieurs concentrations en DTNB sont testées.

A  $-20^{\circ}\text{C}$  (bain d'éthanol refroidi par ajout d'azote liquide), le TMOS et le méthanol sont mélangés dans un ballon. La solution méthanolique de DTNB est ajoutée, suivie de l'APTES. Pour terminer, l'eau est ajoutée et le sol agité pendant une minute. L'APTES catalyse la réaction d'hydrolyse et le mélange doit être refroidi pour ralentir la vitesse de réaction. Les volumes utilisés pour chaque formulation sont détaillés dans le Tableau A.3.

Le sol est versé dans des cuves en plastique de spectroscopie (EVERGREEN, Spectrovettes semi-micro, 201-3111). Pour obtenir des xérogels d'épaisseur 2 mm, 1 mL de sol est directement versé dans chaque cuve. Pour obtenir des xérogels de 800  $\mu\text{m}$  d'épaisseur, 3 plaquettes de silicium de 0,74 mm d'épaisseur sont placées dans la cuve afin d'en diminuer le volume. Dans ce cas, 340  $\mu\text{L}$  de sol sont nécessaires. Le sol gélifie en quelques minutes lorsque sa température remonte. Les cuves sont fermées par un film adhésif poreux (Dominique Dutscher AB0718) afin de commencer le séchage. Au bout d'une semaine, le xérogel est sec et peut être stocké à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

<b>[DTNB]<sub>xérogel</sub></b>	<b><math>8.10^{-2}</math> mol/L</b>	<b><math>8.10^{-3}</math> mol/L</b>
<b>[DTNB]<sub>sol</sub></b>	<b>0,01 mol/L</b>	<b>0,001 mol/L</b>
<b>TMOS</b>	3,571 mL	3,571 mL
<b>MeOH</b>	4,2926 mL	4,7574 mL
<b>DTNB 0,2mol/L dans MeOH</b>	0,5164 mL	0,0516 mL
<b>APTES</b>	0,168 mL	0,168 mL
<b>H<sub>2</sub>O</b>	1,728 mL	1,728 mL

**Tableau A.3 : Volumes de réactifs à utiliser pour la préparation de sols à différentes concentrations en DTNB.**

### 3.2-Xérogels dopés DMACA et HCl pour la détection de la $\beta$ -naphthylamine en absorbance

Des xérogels contenant différentes quantités d'acide chlorhydrique et de DMACA ont été préparés. Le ratio molaire de chaque réactif est le suivant : TMOS/APTES/MeOH/eau = 1/0,03/5/4.

Le DMACA (CAS 6203-18-5, Sigma Aldrich D4506) est introduit via une solution méthanolique. A  $-20^{\circ}\text{C}$  (bain éthanol, azote liquide), le TMOS et le méthanol sont mélangés dans un ballon. La solution

méthanolique de DMACA est ajoutée, suivie de l'APTES et de l'acide chlorhydrique (CAS 7647-01-0, Sigma Aldrich 320331). Pour terminer, l'eau est ajoutée et le sol agité pendant une minute. Les volumes utilisés pour chaque formulation sont détaillés dans le Tableau A.4.

1 mL de sol est versé dans des cuves en plastique de spectroscopie (EVERGREEN). Les cuves sont bouchées hermétiquement le temps que le sol gélifie. Puis le bouchon est retiré et remplacé par un film adhésif poreux (Dominique Dutscher AB0718).

[DMACA] <sub>xérogel</sub> (mmol/L)	10	10	10	2	2	2	1	0,5	0,1	0,1
[HCl] <sub>xérogel</sub> (mmol/L)	0,5	1	2	0,5	1	2	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-2</sup>	0,5	10 <sup>-4</sup>
TMOS (mL)	1,7856	1,7856	1,7856	1,7856	1,7856	1,7856	3,8	3,8	3,8	3,8
MeOH + DMACA 50 mmol/L (mL)	0,1291	0,1291	0,1291	0,0258	0,0258	0,0258	0,0274	0,0137	/	/
MeOH + DMACA 5 mmol/L (mL)	/	/	/	/	/	/	/	/	0,0275	0,0275
MeOH (mL)	2,3012	2,3012	2,3012	2,4045	2,4045	2,4045	5,1448	5,1585	5,1447	5,1447
APTES (mL)	0,0842	0,0842	0,0842	0,0842	0,0842	0,0842	0,1793	0,1793	0,1793	0,1793
Eau (mL)	0,8371	0,8081	0,7564	0,8371	0,8081	0,7564	1,7014	1,7014	1,7815	1,7014
HCl 37% (mL)	0,0269	0,0559	0,1076	0,0269	0,0559	0,1076	/	/	0,0572	/
HCl 10 <sup>-1</sup> mol/L (mL)	/	/	/	/	/	/	0,1374	0,1374	/	/
HCl 10 <sup>-3</sup> mol/L (mL)	/	/	/	/	/	/	/	/	/	0,1374
Temps de gélification	2 jours	5 jours	3 jours	10 minutes	4 jours	3 jours	3 jours	3 jours	10 minutes	2 minutes

Tableau A.4 : Volumes de réactifs à utiliser pour la préparation de sol à différentes concentrations en HCl et DMACA.

### 3.3-Xérogels pour la détection de la $\beta$ -naphthylamine en fluorescence

Dans un bain à -20°C, le TMOS et le méthanol sont mélangés dans un ballon, l'APTES est ajouté suivi de l'eau. Le sol est agité pendant une minute. Les volumes utilisés pour chaque formulation sont détaillés dans le Tableau A.5.

Pour obtenir un monolithe de taille 2 mm x 5 mm x 15 mm, 1 mL de sol est versé dans des cuves en plastique de spectroscopie (EVERGREEN, Spectrovettes semi-micro, 201-3111). Le sol gélifie en moins de 3 minutes. Les cuves sont bouchées avec un film adhésif poreux (Dominique Dutscher AB0718). Les gels sèchent à température ambiante pendant deux semaines. Pour obtenir des films minces, 500  $\mu$ L

de sol sont déposés sur une lame de microscope en verre, elle-même fixée sur un appareil de spin-coating. Après une minute à 1000 tours/minute, le sol s'est étalé sur la lame et a gélifié puis séché.

	Monolithes		Films minces	
	Rapport molaire	Volumes (mL)	Rapport molaire	Volumes (mL)
TMOS	1	1,786	1	1,786
MeOH	5	2,430	4	1,945
APTES	0,06	0,168	0,03	0,084
H <sub>2</sub> O	4	0,864	4	0,864

Tableau A.5 : Rapport molaires et volumes de réactifs utilisés pour la synthèse de xérogels et de films minces pour la détection de la  $\beta$ -naphthylamine en fluorescence.

### 3.4-Xérogels sans molécule sonde pour la détection de nitrophénols

#### 3.4.1-Porogène 3-aminopropyltriéthoxysilane (APTES)

Le rapport molaire choisi entre le tétraméthylorthosilicate (TMOS, CAS 681-84-5, Sigma Aldrich 87682), le méthanol (MeOH, Sigma Aldrich 322415), et l'eau MilliQ est le suivant : TMOS/MeOH/eau = 1/5/4. Le 3-aminopropyltriéthoxysilane (APTES, CAS 919-30-2, Sigma Aldrich A3648) est ajouté en quantités variables.

A -20°C (bain éthanol, azote liquide), le TMOS et le méthanol sont mélangés dans un ballon. Puis l'APTES est ajouté et enfin l'eau. Le sol agité pendant une minute. Les volumes utilisés pour chaque formulation sont détaillés dans le Tableau A.6. L'APTES catalyse la réaction d'hydrolyse et le mélange doit être refroidi pour ralentir la vitesse de réaction. **La gélification intervient d'autant plus vite que la quantité d'APTES introduite est importante.**

Le sol est versé dans des cuves en plastique de spectroscopie (EVERGREEN, Spectrovettes semi-micro, 201-3111). Pour obtenir des xérogels d'épaisseur 2 mm, 1 mL de sol est directement versé dans chaque cuve. Une fois que les solutions ont gélifié, les cuves sont fermées par un film adhésif poreux (Dominique Dutscher AB0718) afin de commencer le séchage. Au bout d'une semaine, le xérogel est sec et peut être stocké à -20°C.

	APTES 0,03		APTES 0,06		APTES 0,08	
	Rapport molaire	Volumes (mL)	Rapport molaire	Volumes (mL)	Rapport molaire	Volumes (mL)
TMOS	1	1,786	1	1,786	1	1,786
MeOH	5	2,430	5	2,430	5	2,430
APTES	0,03	0,084	0,06	0,168	0,08	0,224
H <sub>2</sub> O	4	0,864	4	0,864	4	0,864
Temps de gélification	3 minutes		1 minute		Quelques secondes	

Tableau A.6 : Rapport molaires et volumes de réactifs utilisés pour la synthèse de xérogels contenant de l'APTES.

### 3.4.2-Porogène : 4-aminobutyltriéthoxysilane (ABTES)

Les rapports molaire choisis restent le même que pour les xérogels avec l'APTES : TMOS/MeOH/eau = 1/5/4. Le 4-aminobutyltriéthoxysilane (ABTES, CAS 3069-30-5, ABCR AB110803) est ajouté en quantités variables.

A -20°C (bain éthanol, azote liquide), le TMOS et le méthanol sont mélangés dans un ballon. Puis l'APTES est ajouté et enfin l'eau. Le sol agité pendant une minute. Les volumes utilisés pour chaque formulation sont détaillés dans le Tableau A.7. L'ABTES catalyse la réaction d'hydrolyse et le mélange doit être refroidi pour ralentir la vitesse de réaction. La gélification intervient d'autant plus vite que la quantité d'ABTES introduite est importante.

Le sol est versé dans des cuves en plastique de spectroscopie (EVERGREEN, Spectrovettes semi-micro, 201-3111). Pour obtenir des xérogels d'épaisseur 2 mm, 1 mL de sol est directement versé dans chaque cuve. Une fois que les solutions ont gélifié, les cuves sont fermées par un film adhésif poreux (Dominique Dutscher AB0718) afin de commencer le séchage. Au bout d'une semaine, le xérogel est sec et peut être stocké à -20°C.

	<b>ABTES 0,03</b>	<b>ABTES 0,06</b>	<b>ABTES 0,08</b>	<b>ABTES 0,1</b>	<b>ABTES 0,15</b>	<b>ABTES 0,2</b>
<b>TMOS (mL)</b>	1,786	1,786	1,786	1,786	1,786	1,786
<b>MeOH (mL)</b>	2,430	2,430	2,430	2,430	2,430	2,430
<b>ABTES (mL)</b>	0,090	0,180	0,240	0,300	0,450	0,601
<b>H<sub>2</sub>O (mL)</b>	0,864	0,864	0,864	0,864	0,864	0,864
<b>Temps de gélification</b>	3 minutes	1 minute	Quelques secondes	Quelques secondes	Quelques secondes	Quelques secondes

**Tableau A.7 : Volumes de réactifs utilisés pour la synthèse de xérogels contenant différents ratio d'ABTES.**

### 3.4.3-Porogène : p-aminophényltriméthoxysilane (PhTMOS)

Le rapport molaire choisi entre le tétraméthylorthosilicate (TMOS, CAS 681-84-5, Sigma Aldrich 87682), le méthanol (MeOH, Sigma Aldrich 322415), et l'eau MilliQ est le suivant : TMOS/MeOH/eau = 1/5/4. Le p-aminophényltriméthoxysilane (PhTMOS, CAS 33976-43-1, ABCR AB110810) est ajouté en quantités variables. Il est sous forme solide ; une solution mère dans le méthanol est réalisée avec une concentration de 0,05 mol/L.

A -20°C (bain éthanol, azote liquide), le TMOS et le méthanol sont mélangés dans un ballon. Puis le PhTMOS est ajouté et enfin l'eau. Le sol agité pendant une minute. Les volumes utilisés pour chaque formulation sont détaillés dans le Tableau A.8.

Le sol est versé dans des cuves en plastique de spectroscopie (EVERGREEN, Spectrovettes semi-micro, 201-3111). Pour obtenir des xérogels d'épaisseur 2 mm, 1 mL de sol est directement versé dans chaque cuve. Tant que la solution n'a pas gélifié, les cuves sont fermées hermétiquement. Une fois que les solutions ont gélifié, les cuves sont fermées par un film adhésif poreux (Dominique Dutscher AB0718) afin de commencer le séchage. Au bout d'une semaine, le xérogel est sec et peut être stocké à -20°C.

	PhTMOS 3.10 <sup>-5</sup>		PhTMOS 6.10 <sup>-5</sup>		PhTMOS 8.10 <sup>-5</sup>	
	Rapport molaire	Volumes (mL)	Rapport molaire	Volumes (mL)	Rapport molaire	Volumes (mL)
TMOS	1	1,786	1	1,786	1	1,786
MeOH	5	2,424	5	2,416	5	2,412
PhTMOS	0,03	0,0072	0,06	0,0144	0,08	0,0192
H <sub>2</sub> O	4	0,864	4	0,864	4	0,864
Temps de gélification	2 jours		2 jours		2 jours	

Tableau A.8 : Rapport molaires et volumes de réactifs utilisés pour la synthèse de xérogels contenant du PhTMOS.

### 3.4.4-Porogène : 3-aminopropyltriéthoxysilane (APTES) et Triméthoxy(3,3,3-trifluoropropyl)silane (FTMOS)

Les rapports molaire choisis sont les suivants : TMOS/MeOH/APTES/eau = 1/5/0,03/4. Le triméthoxy(3,3,3-trifluoropropyl)silane (FTMOS, CAS 429-60-7, Sigma 91877) est ajouté en quantités variables.

A -20°C (bain éthanol, azote liquide), le TMOS et le méthanol sont mélangés dans un ballon. Puis l'APTES et le FTMOS sont ajoutés et enfin l'eau. Le sol agité pendant une minute. Les volumes utilisés pour chaque formulation sont détaillés dans le Tableau A.9.

Le sol est versé dans des cuves en plastique de spectroscopie (EVERGREEN, Spectrovettes semi-micro, 201-3111). Pour obtenir des xérogels d'épaisseur 2 mm, 1 mL de sol est directement versé dans chaque cuve. Une fois que les solutions ont gélifié, les cuves fermées par un film adhésif poreux (Dominique Dutscher AB0718) afin de commencer le séchage. Au bout d'une semaine, le xérogel est sec et peut être stocké à -20°C.

	FTMOS 0,0025	FTMOS 0,005	FTMOS 0,0075	FTMOS 0,01	FTMOS 0,02	FTMOS 0,04	FTMOS 0,06
TMOS (mL)	1,786	1,786	1,786	1,786	1,786	1,786	1,786
MeOH (mL)	2,430	2,430	2,430	2,430	2,430	2,430	2,430
APTES (mL)	0,084	0,084	0,084	0,084	0,084	0,084	0,084
FTMOS (mL)	0,0058	0,0115	0,0173	0,0230	0,0461	0,0921	0,1382
H <sub>2</sub> O (mL)	0,864	0,864	0,864	0,864	0,864	0,864	0,864
Temps de gélification	3 minutes	3 minutes	3 minutes	3 minutes	3 minutes	3 minutes	3 minutes

Tableau A.9 : Volumes de réactifs utilisés pour la synthèse de xérogels contenant différents ratio de FTMOS.

## Annexe 4 : Caractérisation de la porosité d'un matériau par adsorption-désorption d'azote

### 4.1-Adsorption

Les solides poreux, comme les xérogels par exemple, développent une surface spécifique (interface entre le solide et le gaz) élevée. La physisorption est le processus dans lequel la molécule de gaz adsorbée adhère à la surface grâce à des interactions intermoléculaire faibles de Van der Waals. Dans ce cas, la condensation du gaz sur la surface conduit à une vraie phase liquide, sans altération des molécules de gaz. De plus, ce processus est réversible.

L'étude de l'adsorption d'un gaz sur la surface d'un solide montre qu'il y a formation d'un équilibre entre la pression de ce gaz et la quantité de gaz adsorbé. Une isotherme d'adsorption est déterminée par adsorption d'un gaz inerte à la surface des pores du matériau. On observe ainsi cinq types d'isothermes d'adsorption, correspondant à un type d'adsorption et des types de matériaux différents.

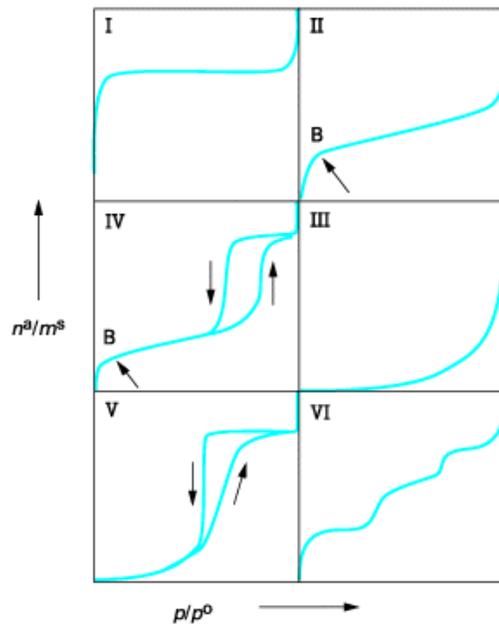


Figure A.6 : Classifications des isothermes d'adsorption données par l'IUPAC. [6]

- Type I : la quantité de gaz adsorbé croît très vite avec la pression, elle atteint un plateau. Cette isotherme est caractéristique des solides ayant des pores de très petit diamètre ; Ces micropores se remplissent à une pression d'autant plus basse que leur diamètre est faible.

- Type II : L'isotherme de type II correspond au cas de figure précédent, avec en plus, après saturation de la surface du solide par une première couche, formation de plusieurs couches de molécules gazeuses. cette isotherme est obtenue avec des adsorbants non poreux ou macroporeux à la surface desquels la couche adsorbée s'épaissit progressivement.
- Type IV : Cette isotherme suit, aux basses pressions, une courbe de type II (monocouche suivi d'une multicouche). Un plateau aux pressions élevées indique un remplissage des pores suivi d'une adsorption à la surface du matériau. Cette isotherme est caractéristique des solides à pores moyens de diamètre entre 2 et 50 nm (mésoporeux). Par ailleurs, l'isotherme de désorption présente une hystérésis due à la condensation dans les pores.
- Type III et V : ces isothermes diffèrent des autres aux faibles pressions. Elles correspondent à la formation de plusieurs couches sur la surface du solide, avec une formation de monocouche quasi-inexistante. Ceci est le cas lorsque les interactions adsorbant/adsorbables sont plus faibles que les interactions adsorbable/adsorbable.
- Type VI : ce type d'isotherme a été observé dans le cas de l'adsorption par des surfaces énergétiquement homogènes sur lesquelles les couches adsorbées se forment l'une après l'autre.

La surface spécifique et la porosité d'un matériau sont déterminées à partir d'une mesure de l'isotherme d'adsorption d'azote à sa température de liquéfaction (77 K).

Le modèle le plus simple pour traduire une isotherme d'adsorption est celui de Langmuir. Ce modèle repose sur plusieurs hypothèses :

- ✓ La surface est uniforme, on considère qu'il n'y a pas d'hétérogénéités et que les sites actifs ont tous la même énergie.
- ✓ L'adsorption est localisée : une seule molécule par site et pas d'interaction entre les molécules adsorbées.
- ✓ L'enthalpie d'adsorption  $\Delta H_{ads}$  est donc indépendante du taux de recouvrement des sites actifs de la surface.
- ✓ Il y a équilibre entre les molécules adsorbées et non adsorbées.

Soient  $S$  la surface du solide et  $\theta_A$  la fraction de ce solide recouverte par des molécules  $A$  physisorbées. La vitesse d'adsorption est proportionnelle à la surface du solide inoccupée :  $S(1 - \theta_A)$  et à la pression du gaz  $p_A$  :

$$v_{ads} = \bar{k}_A p_A (1 - \theta_A) S$$

La vitesse de désorption est proportionnelle à la surface occupée :

$$v_{des} = \bar{k}_A \theta_A S$$

Puisqu'il y a équilibre entre les molécules en phase gazeuse et celles qui sont adsorbées, on peut écrire :

$$v_{ads} = v_{des} \Rightarrow \bar{k}_A p_A (1 - \theta_A) S = \bar{k}_A \theta_A S \Rightarrow \theta_A = \frac{b_A p_A}{1 + b_A p_A} \text{ avec } b_A = \frac{\bar{k}_A}{\bar{k}_A} \text{ (coefficient d'adsorption de A)}$$

Si  $b_A$  est élevé, l'adsorption se fait préférentiellement par rapport à la désorption, alors la monocouche est obtenue dès les basses pressions et recouvre la quasi-totalité de la surface du solide.

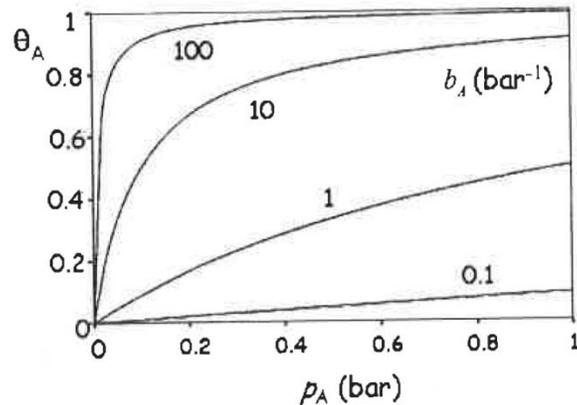


Figure A.7 : Evolution des isothermes de Langmuir pour différents coefficients d'adsorption  $b_A$

## 4.2-Détermination de la surface spécifique (Méthode de Brunauer, Emmett et Teller, BET)

Le modèle de Langmuir ne permet pas de décrire les isothermes de type II et IV pour lesquelles il y a empilement de plusieurs couches. Le modèle BET repose sur la formation de multicouches : la première sert de substrat pour une adsorption supplémentaire. Sur chaque couche, il y a équilibre entre le nombre de molécules qui s'adsorbent et celles qui se désorbent. On peut donc, sur chaque couche à l'équilibre, admettre que la surface demeure constante.

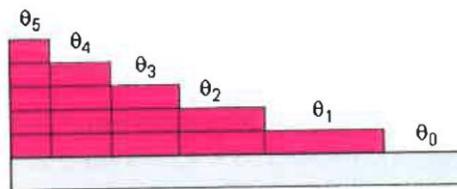


Figure A.8 : représentation schématique d'une adsorption multicouche à la surface d'un solide

Brunauer, Emmett et Teller admettent les hypothèses de base de Langmuir (un seul type de site d'adsorption, indépendants entre eux; absence d'interactions entre les molécules adsorbées). Ils considèrent que, pour chaque pression d'équilibre  $p$ , la théorie de Langmuir s'applique entre la fraction de surface non recouverte  $\theta_0$  et la fraction de surface recouverte  $\theta_1$ , entre la fraction  $\theta_1$  et la fraction  $\theta_2$ , etc.

$$\text{Ainsi, à l'équilibre, pour la couche } \theta_0 : v_{ads,0} = \bar{k}_1 p \theta_0 = v_{des,0} = \bar{k}_1 \theta_1$$

L'apparition de la couche 1 vient de l'adsorption sur la couche 0 (support) et de la désorption de la couche 2 (équivalent à l'adsorption dans le modèle de Langmuir). Et la disparition de la couche 1 résulte de la désorption de la couche 1 et de l'adsorption de la couche 2 (équivalent à la désorption dans le modèle de Langmuir). On a donc :

$$v_{ads,1} = \underbrace{\bar{k}_1 p \theta_0}_{\text{Adsorption sur le support}} + \underbrace{\bar{k}_2 \theta_2}_{\text{Désorption de la couche 2}} = v_{des,1} = \underbrace{\bar{k}_1 \theta_1}_{\text{Désorption de la couche 1}} + \underbrace{\bar{k}_2 p \theta_1}_{\text{Adsorption de la couche 2}}$$

En comparant ces deux équations, on obtient la fraction recouverte de la couche 2 :

$$v_{ads,1} = \bar{k}_1 p \theta_0 + \bar{k}_2 \theta_2 = \bar{k}_1 p \theta_0 + \bar{k}_2 p \theta_1 \Rightarrow \bar{k}_2 \theta_2 = \bar{k}_2 p \theta_1 \Rightarrow \theta_2 = \frac{\bar{k}_2}{\bar{k}_2} p \theta_1 = b_2 p \theta_1$$

Par itération, on trouve que la fraction de la surface recouverte par la couche n est  $\theta_n = \frac{\bar{k}_n}{\bar{k}_n} p \theta_{(n-1)}$

La première couche est adsorbée par le support et sert de substrat pour les adsorptions suivantes. Ainsi, pour  $n \geq 2$ , les adsorptions sont identiques : condensation de molécules sur des molécules analogues. Tous les coefficients d'adsorption sont donc équivalents:  $\frac{\bar{k}_2}{\bar{k}_2} p = \frac{\bar{k}_3}{\bar{k}_3} p = \dots = \frac{\bar{k}_n}{\bar{k}_n} p$

On pose  $\frac{\bar{k}_1}{\bar{k}_1} p = Cx$  où C est une constante de proportionnalité, et x est la pression réduite :  $x = \frac{p}{p_0}$

On peut alors ré-exprimer toutes les surfaces :

$$\theta_1 = Cx\theta_0$$

$$\theta_2 = x\theta_1 = Cx^2\theta_0$$

....

$$\theta_n = x\theta_{n-1} = Cx^n\theta_0$$

En ramenant la somme des fractions surfaciques  $\theta_i$  à l'unité, on obtient :

$$1 = \theta_0 + \theta_1 + \dots + \theta_n = \theta_0(1 + C(x + x^2 + x^3 + \dots + x^n)) \approx \theta_0(1 + C \frac{x}{1-x})$$

$$\theta_{tot} = \theta_0(1 + C \frac{x}{1-x}) = 1$$

$$\theta_0 = \frac{1}{1 + C \frac{x}{1-x}}$$

Soient  $m_m$  la masse de molécules nécessaires et  $V_m$  volume de la monocouche pour faire une monocouche et  $m_{ads}$  la masse totale de molécules adsorbées :

$$m_{ads} = m_m(\theta_1 + 2\theta_2 + 3\theta_3 + \dots) = m_m(Cx\theta_0 + 2Cx\theta_0 + 3Cx\theta_0 + \dots) = m_m \frac{Cx\theta_0}{(1-x)^2}$$

En remplaçant  $\theta_0$  par l'expression trouvée au-dessus, on obtient :  $m_{ads} = m_m C \frac{x}{(1-x)} \left[ \frac{1}{1+(C-1)x} \right]$

Si  $x$  tend vers 1,  $m_{ads}$  tend vers l'infini, ceci ne peut être vrai que pour  $P = P_0$ .

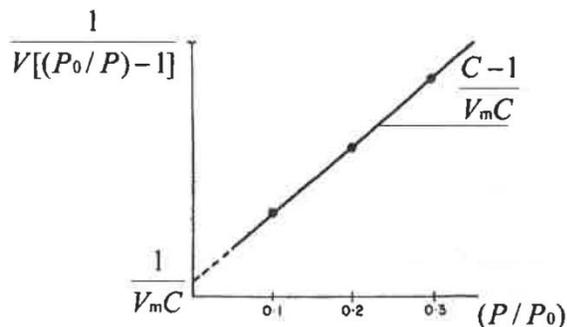
$$\frac{\bar{k}_n}{k_n} p_0 = 1$$

$$\frac{\bar{k}_n}{k_n} p = \frac{x}{1} \Rightarrow x = \frac{p}{p_0}$$

On arrive ainsi à l'expression BET :  $\frac{m_{ads}}{m_m} = \frac{C}{(1-\frac{p}{p_0})} \frac{\frac{p}{p_0}}{(1-(C-1)\frac{p}{p_0})}$

Or, en pratique, on mesure des volumes adsorbés en fonction de pressions, on représentera donc l'expression suivante de l'isotherme BET qui permet de mesurer le volume d'une monocouche:

$$\frac{1}{V \left( \frac{p}{p_0} - 1 \right)} = \frac{1}{V_m C} + \frac{C-1}{V_m C} \frac{p}{p_0}$$



A noter : pour de faibles valeurs de  $p/p_0$ , on retrouve l'équation de Langmuir.

La surface spécifique (en  $m^2/g$ ) s'exprime alors :  $S = \frac{V_m}{22,4m} A_m N_A$  avec  $V_m$  (en L) le volume

d'une monocouche,  $N_A$  le nombre d'Avogadro (en  $mol^{-1}$ ),  $A_m$  l'aire occupée (en  $m^2$ ) par une molécule de gaz et  $m$  (en g) la masse de solide et  $22,4 L \cdot mol^{-1}$  le volume molaire en conditions normales de température et pression.

Ce **modèle n'est applicable qu'aux faibles pressions relatives** dans le cas d'isothermes de type IV et V. Pour ce type de matériaux, le phénomène de condensation capillaire se produit au-delà d'une certaine pression relative.

### 4.3-Détermination de la distribution en taille des pores grâce à la théorie de la fonctionnelle de densité (DFT)

Pour des échantillons microporeux (diamètre des pores inférieurs à 2 nm), la méthode de Horvath et Kawazoe (HK) est la plus souvent utilisée pour déterminer la répartition en taille des pores. À l'inverse, pour des échantillons mésoporeux ( $2 \text{ nm} < d < 50 \text{ nm}$ ), le modèle Barrett, Joyner et Halenda (BJH), basé sur la loi de Kelvin et la condensation capillaire dans les pores, est adapté.

Cependant, pour un matériau présentant des micro et mésopores, aucune de ces méthodes n'est satisfaisante. La méthode DFT permet de déterminer le profil de densité d'adsorbat à l'équilibre, et ceci en minimisant l'énergie libre des molécules d'adsorbat. La densité décroît lorsque la distance des molécules avec les parois du solide augmente. Des isothermes associées à un type de matériau adsorbant, un gaz adsorbé, une géométrie de pores et une taille de pores sont calculées. Ainsi, un ensemble d'isothermes (kernel d'isothermes) est obtenu pour un système adsorbat/adsorbant donnée. L'isotherme mesurée expérimentalement est reconstruite à partir d'une somme d'isothermes théoriques. Pour nos matériaux, les isothermes théoriques choisies sont calculées pour une surface de type oxyde métallique, avec des pores de forme cylindrique. Le logiciel utilisé est Microactive (Micromeritics), v 3.00.

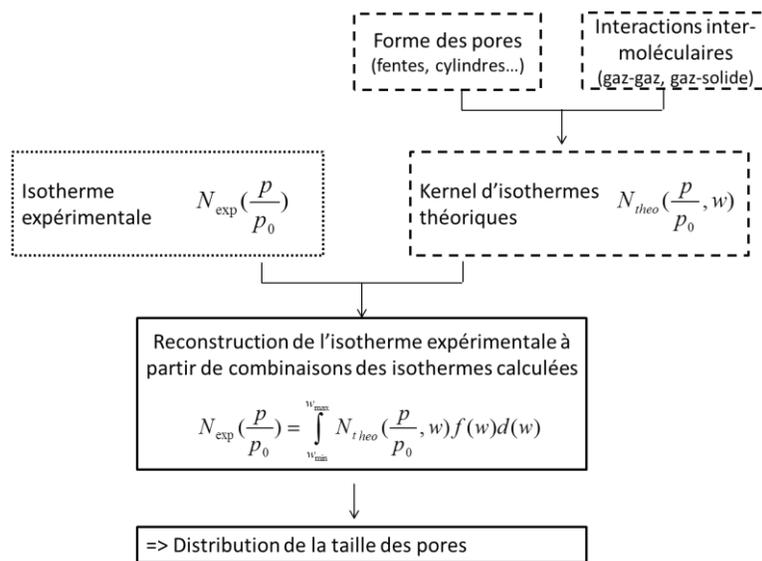


Figure A.9 : Description de la méthode DFT pour la détermination de la répartition de la taille des pores. [6]

Les isothermes d'adsorption de diazote à 77K ont été mesurées avec un ASAP 2420 (Micromeritics). Les échantillons sont préalablement chauffés sous vide afin d'éliminer les molécules déjà adsorbées sur la surface (en majorité de l'eau). Les isothermes sont acquises pour des pressions relatives entre  $10^{-6}$  et 1. Aux faibles pressions relatives, les molécules d'azote s'adsorbent en premier lieu dans les micropores.

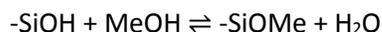
## Annexe 5 : Dosage de l'eau dans les xérogels avec le procédé Karl-Fischer

Afin de comparer l'affinité des xérogels de différentes formulations pour l'eau, la méthode de titrage Karl-Fischer a été utilisée. Ce titrage repose sur deux réactions successives :



En général, l'amine R'N utilisée est la pyridine ou l'imidazole. L'appareil utilisé est un Cou-Lo Compact (GR Scientific), permettant de procéder à des dosages coulométriques. Dans ce mode de dosage, le diiode participant à la réaction est généré directement dans la cellule de titrage par une réduction de l'iodure. La quantité d'eau est calculée à partir du courant nécessaire pour former le diiode.

Lors du dosage Karl-Fischer, le choix du solvant est important. Les réactifs les plus couramment utilisés sont à base de méthanol et imidazole (Hydranal Coulomat A et Hydranal Coulomat CG, Sigma Aldrich). Cependant, les silanols réagissent avec ce dernier pour former un alkoxyde selon le schéma ci-dessous.



Cette réaction secondaire génère de l'eau. Elle contribue donc à en surestimer la quantité présente dans les échantillons. Pour l'éviter, le fournisseur de l'appareil Karl Fischer conseille l'utilisation de réactifs sans méthanol mais avec un mélange de 2-méthoxyéthanol et de chloroforme (Hydranal Coulomat AK et Hydranal Coulomat CGK, Sigma Aldrich). La différence entre les teneurs en eau déterminées avec les réactif A-CG et avec les réactif AK-CGK doit permettre d'évaluer le nombre de silanols de surface. En effet comme le montre la réaction ci-dessus, le Coulomat A-CG génère autant de molécules d'eau supplémentaires que le nombre de silanols libres.

Dans un premier temps, les xérogels sont broyés puis séchés sous rampe à vide à 80°C pendant 2 heures. La poudre est ensuite exposée à l'humidité ambiante (53%, 22°C) pendant 5 minutes. Les poudres sont ensuite mises en suspension dans de l'acétonitrile anhydre dont la teneur en eau a été mesurée puis soustraite aux valeurs mesurées pour les silices. Deux mesures sont réalisées sur chaque échantillon :

Avec les réactifs à base de méthanol (Hydranal Coulomat A, Fluka 34807 et Hydranal Coulomat CG, Fluka 34840), une masse connue de suspension est injectée dans la cellule. Une agitation vigoureuse est maintenue pendant 30 minutes avant le dosage afin de favoriser la réaction entre le méthanol et les silanols.

Avec le réactif à base de 2-méthoxyéthanol et chloroforme (Hydranal Coulomat AK, Fluka 34820 et Hydranal Coulomat CGK, Fluka 34821), une masse connue de suspension est injectée dans la cellule et le titrage commence immédiatement après l'ajout de la suspension.

	APTES 0,03	ABTES 0,1	ABTES 0,15	APTES 0,03 + FTMOS 0,06
Eau présente dans le matériau avant exposition (mg/g de solide)	19	21,9	50,5	11,5
eau totale après exposition (mg/g de solide)	80,2	50,1	63,8	40,0
eau adsorbée pendant l'exposition (mg/g de solide)	61	28	13	29
Volume poreux mesuré par adsorption/désorption d'azote (cm <sup>3</sup> /g)	0,305	0,202	0,203	0,253
% du volume poreux occupé par H <sub>2</sub> O venant de l'exposition	20	10	4	18

	APTES 0,03	ABTES 0,1	ABTES 0,15	APTES 0,03 + FTMOS 0,06
Eau adsorbée (AK-CGK) (mg/g de solide)	80,2	50,1	63,8	40
Eau adsorbée + eau issue de l'alkoxylation des silanols (mg/g de solide)	88,3	53,2	71,6	44,9
Eau issue des silanols (mg/g de solide)	8,1	3,1	7,8	4,9
Eau issue des silanols (molécules/g de solide)	$2,7 \cdot 10^{20}$	$1,0 \cdot 10^{20}$	$2,6 \cdot 10^{20}$	$1,6 \cdot 10^{20}$
Surface BET (m <sup>2</sup> /g)	477	322	332	350
Concentration en silanols (Si-OH/nm <sup>2</sup> )	0,57	0,32	0,78	0,45

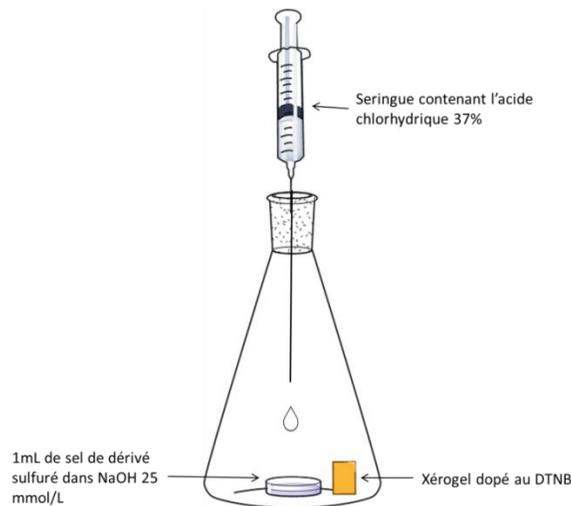
# Annexe 6 : Protocole d'exposition aux composés volatils

## 6.1-Exposition aux composés soufrés volatils (CSV)

La réactivité des capteurs a été testée vis-à-vis de deux VSC cibles : le sulfure d'hydrogène ( $H_2S$ ) et le méthane thiol ( $CH_3SH$ ). Ces composés sont générés par addition d'acide chlorhydrique concentré sur des solutions contenant le sel de dérivés sulfurés ( $Na_2S$  et  $CH_3SNa$  pour  $H_2S$  et  $CH_3SH$  respectivement). [7] Etant donné leur faible solubilité dans l'eau, une fraction importante quitte la phase aqueuse pour la phase gazeuse.

Les expositions se font dans des erlenmeyers de 100 mL avec un col large fermés par un bouchon à jupe. Dans un erlenmeyer, on place un petit récipient contenant 1 mL d'une solution de sel de dérivé sulfuré dans NaOH 25 mmol/L ainsi qu'un xérogel dopé au DTNB. L'acide chlorhydrique est ajouté à la solution via une seringue à travers le bouchon à jupe. Un barreau aimanté dans le petit récipient en verre assure l'homogénéité de la solution.

Afin de vérifier la libération de  $H_2S$ , le xérogel est remplacé par une bandelette imprégnée d'acétate de plomb qui noircit.



**Figure A.10: Schéma du montage utilisé pour l'exposition de xérogels à des atmosphères calibrées en VSC.**

Il est ainsi possible d'obtenir des atmosphères calibrées en VSC en ajustant la concentration dans la phase aqueuse. Le calcul donnant la concentration en sel de dérivé sulfuré à introduire dans la phase aqueuse ( $C_i$ ) pour obtenir une concentration fixée dans la phase gazeuse (en ppm) est détaillé ci-dessous.

D'après la loi de Henry, à l'équilibre, la quantité totale de composé se répartit entre la phase gazeuse et la phase aqueuse telle que :  $H_{cc} = \frac{C_{gaz}}{C_{aq}}$  où  $C_{gaz}$  et  $C_{liq}$  sont respectivement les concentrations dans la phase gazeuse et dans la phase aqueuse (en mol/L).

Une concentration de  $n$  ppm correspond à une concentration en phase gazeuse de  $C_{gaz}$  en mol/L:

$$C_{gaz} = \frac{n \cdot 10^{-6}}{V_m}$$

Où  $V_m$  est le volume molaire du composé sous forme gazeuse.  $V_m=24$  L/mol à 20°C et 1 atm.

D'après la loi de Henry, à l'équilibre, la concentration dans la phase aqueuse est donnée par :

$$C_{aq} = C_{i,gaz} \cdot H_{cc}$$

$$C_{aq} = \frac{n \cdot 10^{-6}}{V_m} \cdot H_{cc}$$

La quantité de matière totale requise à l'état initial est la somme des quantités de matière à l'équilibre dans la phase aqueuse et dans la phase gazeuse :

$$n_{tot} = C_{gaz} \cdot V_{gaz} + C_{aq} \cdot V_{aq}$$

$$n_{tot} = \frac{n \cdot 10^{-6}}{V_m} \cdot (H_{cc} \cdot V_{aq} + V_{gaz})$$

Donc, la concentration en sel de dérivé sulfuré à introduire dans la phase aqueuse à l'état initial est donnée par :

$$C_i = \frac{n \cdot 10^{-6}}{V_m \cdot V_{aq}} \cdot (H_{cc} \cdot V_{aq} + V_{gaz})$$

Ces sels de dérivés sulfurés ( $\text{Na}_2\text{S}$  ou  $\text{CH}_3\text{SNa}$ ) sont dissouts dans de l'eau contenant 25 mmol/L de NaOH. De cette manière, le pH de la solution est supérieur au  $\text{pK}_a$  des composés afin qu'ils restent sous forme ionique. En effet, leurs  $\text{pK}_a$  respectifs sont 7,0 et 12,0 (couples  $\text{H}_2\text{S}/\text{HS}^-$  et  $\text{CH}_3\text{SH}/\text{CH}_3\text{S}^-$ ).

La quantité d'acide chlorhydrique à ajouter est calculée de manière à neutraliser les 25 mmol/L de NaOH et protoner les dérivés sulfurés. De plus, pour être sûrs que la solution aqueuse soit acide, on

introduit 10 fois plus d'acide que nécessaire :  $V_{HCl} = 10 \cdot \frac{(C_{NaOH} + C_{aq}) \cdot V_{aq}}{C_{HCl}}$ .

Comme l'acide chlorhydrique utilisé est à 37% (soit 12,1 mol/L), et que la concentration en soude est de 25 mmol/L :

$$V_{HCl} = 10 \cdot \frac{(25 \cdot 10^{-3} + C_{aq}) \cdot V_{aq}}{12,1}$$

Les volumes et concentrations utilisés dans le chapitre 2 sont les suivants.

Comparaison des sensibilités vis-à-vis de H<sub>2</sub>S et CH<sub>3</sub>SH :

- H<sub>2</sub>S 5 ppm : V<sub>aq</sub> = 150μL, V<sub>gaz</sub> = 100mL, C<sub>i, Na2S</sub> = 140.10<sup>-6</sup> mol/L, V<sub>HCl</sub> = 3.5μL
- H<sub>2</sub>S 100 ppm : V<sub>aq</sub> = 150μL, V<sub>gaz</sub> = 100mL, C<sub>i, Na2S</sub> = 2,8.10<sup>-3</sup> mol/L, V<sub>HCl</sub> = 3.5μL
- CH<sub>3</sub>SH 10 ppm : V<sub>aq</sub> = 150μL, V<sub>gaz</sub> = 100mL, C<sub>i, Na2S</sub> = 2,8.10<sup>-4</sup> mol/L, V<sub>HCl</sub> = 3.5μL
- CH<sub>3</sub>SH 100 ppm : V<sub>aq</sub> = 150μL, V<sub>gaz</sub> = 100mL, C<sub>i, Na2S</sub> = 2,8.10<sup>-3</sup> mol/L, V<sub>HCl</sub> = 3.5μL

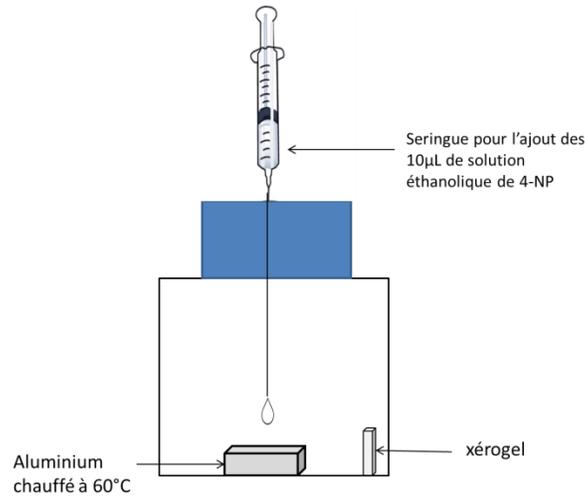
Exposition de xérogels de différentes épaisseurs et de différentes concentrations en DTNB :

- H<sub>2</sub>S 5 ppm : V<sub>aq</sub> = 1 mL, V<sub>gaz</sub> = 99mL, C<sub>i, Na2S</sub> = 2,1.10<sup>-5</sup> mol/L, V<sub>HCl</sub> = 21 μL
- H<sub>2</sub>S 10 ppm : V<sub>aq</sub> = 1 mL, V<sub>gaz</sub> = 99mL, C<sub>i, Na2S</sub> = 4,2.10<sup>-5</sup> mol/L, V<sub>HCl</sub> = 21 μL
- H<sub>2</sub>S 50 ppm : V<sub>aq</sub> = 1 mL, V<sub>gaz</sub> = 99mL, C<sub>i, Na2S</sub> = 2,1.10<sup>-4</sup> mol/L, V<sub>HCl</sub> = 21 μL
- H<sub>2</sub>S 100 ppm : V<sub>aq</sub> = 1 mL, V<sub>gaz</sub> = 99mL, C<sub>i, Na2S</sub> = 4,2.10<sup>-4</sup> mol/L, V<sub>HCl</sub> = 21 μL
- H<sub>2</sub>S 250 ppm : V<sub>aq</sub> = 1 mL, V<sub>gaz</sub> = 99mL, C<sub>i, Na2S</sub> = 1,06.10<sup>-3</sup> mol/L, V<sub>HCl</sub> = 22 μL
- H<sub>2</sub>S 500 ppm : V<sub>aq</sub> = 1 mL, V<sub>gaz</sub> = 99mL, C<sub>i, Na2S</sub> = 2,1.10<sup>-3</sup> mol/L, V<sub>HCl</sub> = 23 μL

Il est important de noter que ces calculs sont valides tant que les valeurs de concentration en composés soufrés sont bien inférieures à la limite de solubilité de ces composés (0,11 mol/L pour H<sub>2</sub>S et 0,48 mol/L pour CH<sub>3</sub>SH).

## 6.2-Exposition au 4-nitrophénol pour la détermination du pH intrapore

Les expositions sont effectuées soit dans un flacon de 100mL fermé par un bouchon percé d'un trou de 1 mm de diamètre. Un monolithe et un morceau d'aluminium (de volume V<sub>alu</sub> = 1,41 mL) préalablement chauffé à 60°C sont placés dans le flacon. Une solution éthanolique de 4-nitrophénol est déposée sur l'aluminium chaud grâce à une micro-seringue à travers le bouchon.



**Figure A.11 : schéma du montage pour l'exposition d'un xérogel à du 4-nitrophénol gazeux à partir d'une solution éthanolique**

Exemple de calcul pour déterminer le volume et la concentration de la solution éthanolique de VOC à introduire dans le cas où le récipient est un flacon de 100 mL :

Le volume de gaz dans le flacon est  $V_{\text{gaz}} = V_{\text{flacon}} - V_{\text{alu}} = 98,59 \cdot 10^{-3}$  L.

Pour une concentration en 4-nitrophénol de 100 ppm, le volume de COV gazeux sera :

$$V_{\text{COV}} = 100 \cdot 10^{-6} \times 98,59 \cdot 10^{-3} = 9,859 \cdot 10^{-6} \text{ L}$$

$$\text{D'où une quantité de COV de : } n_{\text{COV}} = \frac{9,859 \cdot 10^{-6}}{22,4} = 440 \cdot 10^{-9} \text{ mol} = 440 \text{ nmol}$$

Le spectre UV-visible des xérogel est acquis. Lorsque les formes moléculaires (4-NPH) et déprotonnées (4-NP-) sont présentes, le spectre présente 2 pics caractéristiques à 318 et 401 nm. Pour connaître la proportion de chaque forme, les deux pics sont déconvolués. Pour cela, nous avons utilisé, sous le logiciel Origin, un modèle Pseudo-Voigt pour modéliser les pics d'absorbance. Il s'agit de la combinaison linéaire d'une gaussienne et d'une lorentzienne ayant la même position, la même aire et la même largeur à mi-hauteur. Le paramètre  $\eta$  impose la fraction de chaque fonction :

$$y = \eta \cdot L + (1-\eta) \cdot G$$

$$y = y_0 + A \left[ \eta \frac{2}{\pi} \frac{w}{4(x-x_c)^2 + w^2} + (1-\eta) \frac{\sqrt{4 \ln 2}}{\sqrt{\pi} w} e^{-\frac{4 \ln 2}{w^2} (x-x_c)^2} \right]$$

Pour chaque pic, les paramètres sont les suivants :

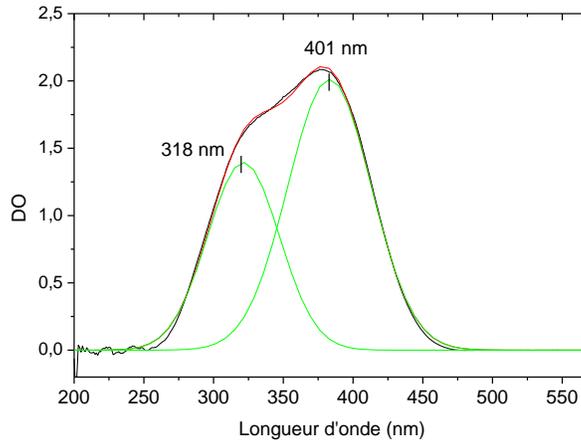
-A l'aire sous la courbe,

-w la largeur à mi-hauteur,

- $x_c$  la longueur d'onde pour laquelle l'absorbance est maximale, respectivement 318 et 401 nm

- $y_0$  l'offset

- $\eta$  est fixé à 0,5



**Figure A.12 : Déconvolution des deux pics d'absorbance du 4-NP. Le spectre expérimental est donné en noir. Les courbes vertes correspondent à la modélisation des deux pics d'absorbance et la courbe rouge à la somme de ces deux pics.**

### 6.3-Expositions à la $\beta$ -naphthylamine

Le protocole est le même que celui décrit ci-dessus. Un xérogel et un morceau d'aluminium ( $V_{\text{alu}} = 1,41 \text{ mL}$ ) préalablement chauffé à  $60^\circ\text{C}$  sont placés dans le récipient.  $10 \mu\text{L}$  d'une solution éthanolique de  $\beta$ naphthylamine sont déposés sur l'aluminium chaud grâce à une micro-seringue. Le récipient est ensuite fermé hermétiquement et placé dans une étuve à  $37^\circ\text{C}$ .

Le volume de gaz dans le flacon est  $V_{\text{gaz}} = V_{\text{flacon}} - V_{\text{alu}} = 98,59 \cdot 10^{-3} \text{ L}$ .

Pour une concentration en  $\beta$ -naphthylamine de 100 ppm, le volume de COV gazeux sera :

$$V_{\text{COV}} = 100 \cdot 10^{-6} \times 98,59 \cdot 10^{-3} = 9,859 \cdot 10^{-6} \text{ L}$$

$$\text{D'où une quantité de COV de : } n_{\text{COV}} = \frac{9,859 \cdot 10^{-6}}{22,4} = 440 \cdot 10^{-9} \text{ mol} = 440 \text{ nmol.}$$

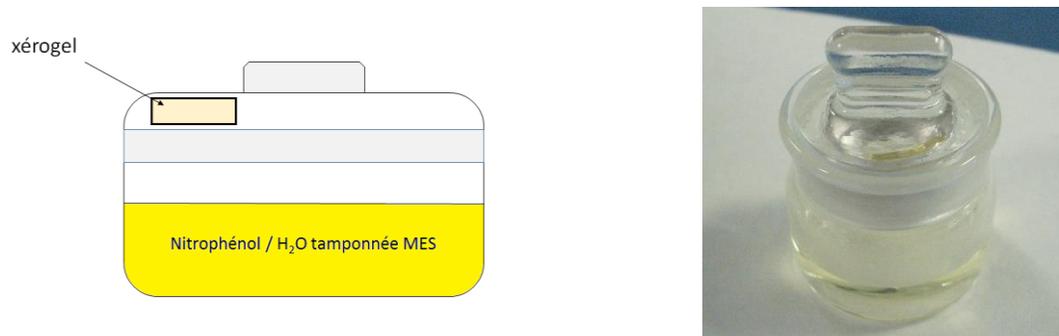
Pour modifier la concentration en  $\beta$ -naphthylamine dans la phase gazeuse, la concentration de la solution éthanolique est ajustée, le volume injecté ( $10 \mu\text{L}$ ) reste constant. Les concentrations utilisées dans sont les suivantes :

- 100 ppm :  $[\beta\text{-NA}] = 44 \text{ mmol/L}$
- 10 ppm :  $[\beta\text{-NA}] = 4,4 \text{ mmol/L}$

## 6.4-Exposition à une solution aqueuse de nitrophénol

Cette exposition se fait dans un vase à peser de 15 mL avec un bouchon rodé. 5 mL de solution aqueuse de à 1 mmol/L, tamponnée avec de l'acide 2-(N-morpholino)éthanesulfonique (MES, pH = 6,1), sont introduits. Le xérogel est placé au-dessus de cette solution, sans qu'il ne la touche. La température est fixée à 37°C. Un spectre UV-visible du capteur est acquis avant et après un temps d'exposition fixé.

Dans ce cas, la concentration en nitrophénol dans la phase gazeuse est le résultat d'un équilibre entre trois phases : le xérogel, la phase gaz et la solution aqueuse.



**Figure A.13 : Schéma et photographie d'une exposition à une solution aqueuse de nitrophénol dans un vase à peser.**

## Annexe 7 : Composition des milieux de culture

### 7.1-Les substrats enzymatiques utilisés

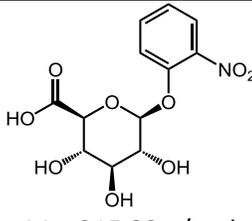
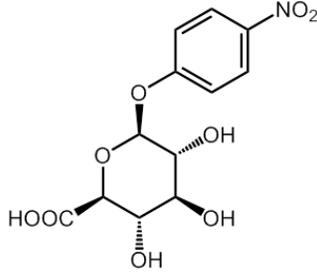
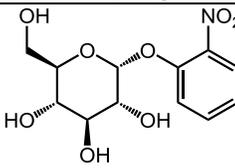
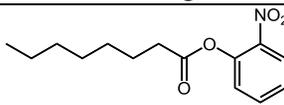
Nom du substrat	Structure	Fournisseur
2-nitrophényl-β-D-glucuronide (2-NPG), CAS 137629-36-8	 M = 315,23 g/mol	Carbosynth (EN 04827)
4-nitrophényl-β-D-glucuronide (4-NPG), CAS 10344-94-2	 M = 315,23 g/mol	Carbosynth (EN 048231101) Sigma (N1627)
2-nitrophényl-α-D-glucopyranoside (α-GLU-2-NP), CAS 56193-44-3	 M = 301,25 g/mol	Carbosynth (EN 438511501)
2-nitrophénylcaprylate (C <sub>8</sub> -2-NP), CAS 104809-25-8	 M = 265,31 g/mol	Carbosynth (EN 15363)

Tableau A.10 : Structure et références des substrats enzymatiques utilisés.

### 7.2-Milieux de culture pour la détection des VSC bactériens

#### 7.2.1-Milieu de culture gélosé pour la détection de VSC émis par *Citrobacter freundii*

Le milieu de culture choisi pour les tests est un milieu riche non spécifique classiquement employé en diagnostic, le bouillon tryptone-soja (TSB, bioMérieux 42-100). A ce milieu sont ajoutés une forme oxydée du soufre : le thiosulfate de sodium, des sels tampons (acide 2-morpholino-éthanesulfonique, pH = 6,1) et un gélifiant (Agar).

Bouillon tryptone-soja (TSB), bioMérieux 42-100	Hydrolysate pancréatique de caséine	bioMérieux	17 g/L
	Hydrolysate enzymatique de soja		3 g/L
	Dextrose		2,5 g/L
	Chlorure de sodium NaCl		5 g/L
	Phosphate de potassium K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>		2,5 g/L
Géifiant	Agar		15 g/L
Source de soufre oxydé	Thiosulfate de sodium (Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )	Sigma 217263	1 g/L
Tampon pH 6,1	MES, forme acide monohydrate	Fluka 69889	15,99 g/L (75 mmol/L)
	MES, forme basique, sel de sodium	Sigma M3058	16,29 g/L (75 mmol/L)

**Tableau A.11 : Composition du milieu de culture gélosé utilisé pour la mise en évidence de la production de VSC par *Citrobacter freundii*.**

### 7.2.2-Milieu de culture liquide pour le suivi en continu de la production de VSC bactériens et la détection de salmonelles en sac *Stomacher*

Le milieu de culture liquide pour les suivis de la production de CSV est un milieu riche non spécifique auquel sont ajoutés un nutriment soufré : le thiosulfate de sodium et des sels tampons (acide 2-morpholino-éthanesulfonique, pH = 6,1).

Base nutritive tamponnée	Nutriments	Peptone de soja	Fluka 87972	2 g/L
		Extrait de levure	Fluka 70161	2 g/L
	Sels minéraux	Chlorure de sodium (NaCl)	Sigma S5886	5 g/L
		Sulfate de magnésium	Sigma M2643	0.25 g/L
	Tampon pH 6,1	MES, forme acide monohydrate	Fluka 69889	15,99 g/L (75 mmol/L)
		MES, forme basique, sel de sodium	Sigma M3058	16,29 g/L (75 mmol/L)
Source de soufre oxydé	Thiosulfate de sodium (Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )	Sigma 217263	2 g/L	

**Tableau A.12 : Composition du milieu de culture liquide utilisé pour le suivi cinétique de la production de VSC par *Citrobacter freundii*.**

### 7.3-Milieu de culture gélosé pour la mise en évidence de l'activité L-alanine-aminopeptidase

Le milieu contenant le substrat L-alanine- $\beta$ -naphthylamide (L-Ala- $\beta$ -NA) est préparé à partir d'un milieu gélosé bioMérieux TSA (Tryptic Soy Agar, Ref. 41 467) et d'une solution éthanolique de L-alanine- $\beta$ -NA dont les compositions sont décrites dans les Tableau A.13 et Tableau A.14.

Peptone de caséine (bovin)	15 g
Peptone de soja	5 g
Chlorure de sodium	5 g
Agar	15 g
Eau purifiée	1 L

**Tableau A.13 : Composition d'un litre de milieu gélosé TSA à pH 7,3.**

Pour obtenir 100 mL de milieu, 100 mL de TSA sont fondus au bain marie à 90°C. Lorsqu'il est refroidi mais encore liquide (50°C), 500  $\mu$ L de solution éthanolique de substrat L-Ala- $\beta$ -NA à 50 mmol/L (filtrée à 0,2  $\mu$ m  $\varnothing$ ) sont introduits. Le milieu gélosé contient ainsi 250  $\mu$ mol/L de L-Ala- $\beta$ -NA. Après homogénéisation, le milieu est immédiatement coulé dans des boîtes de Petri.

Substrat L-Ala $\beta$ -NA (Sigma A2628)	53,7 mg
Ethanol (Fluka 02850)	5 mL

**Tableau A.14 : Composition de la solution à 50 mM de L-Ala- $\beta$ -NA.**

### 7.4-Milieu de culture liquide pour la mise en évidence de l'activité $\beta$ -D-glucuronidase

Le milieu de culture liquide pour la mise en évidence de l'activité enzymatique  $\beta$ -D-glucuronidase est un milieu riche non spécifique auquel sont ajoutés le substrat osmogène : 2-nitrophényl- $\beta$ -D-glucuronide ou 4-nitrophényl- $\beta$ -D-glucuronide ainsi que deux inducteurs et des sels tampons (acide 2-morpholino-éthanesulfonique, pH = 6,1). Le milieu tamponné est autoclavé pour être stérilisé. Une fois le milieu refroidi, une fraction est prélevée dans laquelle sont dissouts le substrat et les inducteurs. Cette fraction est ensuite ajoutée au reste du milieu après filtration à 0,2  $\mu$ m.

Base nutritive tamponnée	Nutriments	Peptone de soja	Fluka 87972	2 g/L
		Extrait de levure	Fluka 70161	2 g/L
	Sels minéraux	Chlorure de sodium (NaCl)	Sigma S5886	5 g/L
		Sulfate de magnésium	Sigma M2643	0,25 g/L
	Tampon pH 6,1	MES, forme acide monohydrate	Fluka 69889	15,99 g/L (75 mmol/L)
		MES, forme basique, sel de sodium	Sigma M3058	16,29 g/L (75 mmol/L)
Substrat osmogène	4-nitrophényl- $\beta$ -D-glucuronide ou 2-nitrophényl- $\beta$ -D-glucuronide	Sigma 73677 Carbosynth EN04827	0,0356 g/L (0,113 mmol/L)	
Inducteurs	Méthyl- $\beta$ -D-glucuronide	Carbosynth MM28859	0,0552 g/L (0,240 mmol/L)	
	Glucuronate de sodium	Sigma G8645	0,108 g/L (0,461 mmol/L)	

**Tableau A.15 : Composition du milieu de culture liquide riche utilisé pour la mise en évidence de l'activité enzymatique  $\beta$ -D-glucuronidase.**

## 7.5-Milieu de culture liquide pour la mise en évidence de l'activité $C_8$ -estérase

Le milieu de culture liquide pour la mise en évidence de l'activité enzymatique  $C_8$ -estérase chez plusieurs espèces de staphylocoques est un milieu riche non spécifique. Le milieu tamponné est autoclavé pour être stérilisé. Une fois le milieu refroidi, une fraction est prélevée dans laquelle est diluée une solution mère contenant le substrat 2-nitrophényl caprylate. Cette solution mère contient le substrat enzymatique et un tensioactif (TWEEN 20) dans 1 mL de diméthylsulfoxyde (DMSO). Cette fraction est ensuite réintégrée au reste du milieu après filtration à 0,2  $\mu$ m.

Base nutritive tamponnée	Nutriments	Peptone de soja	Fluka 87972	2 g/L
		Extrait de levure	Fluka 70161	2 g/L
	Sels minéraux	Chlorure de sodium (NaCl)	Sigma S5886	5 g/L
		Sulfate de magnésium	Sigma M2643	0,25 g/L
	Tampon pH 6,1	MES, forme acide monohydrate	Fluka 69889	15,99 g/L (75 mmol/L)
		MES, forme basique, sel de sodium	Sigma M3058	16,29 g/L (75 mmol/L)
Substrat osmogène	2-nitrophényl-caprylate	Carbosynth EN15363	0,053 g/L (200 µmol/L)	
Tensioactif	TWEEN 20	Sigma P2287	0,53 g/L	

**Tableau A.16 : Composition du milieu de culture liquide riche utilisé pour la mise en évidence de l'activité enzymatique C<sub>8</sub>-estérase.**

## 7.6-Milieu de culture liquide pour la mise en évidence de l'activité $\alpha$ -glucosidase

Le milieu de culture liquide pour la mise en évidence de l'activité enzymatique  $\alpha$ -glucosidase chez plusieurs espèces de staphylocoques est un milieu riche non spécifique. Le milieu tamponné est autoclavé pour être stérilisé. Une fois le milieu refroidi, une fraction est prélevée dans laquelle le substrat enzymatique est dissout. Cette fraction est ensuite ajoutée au reste du milieu après filtration à 0,2 µm.

Pour préparer du milieu en ajoutant en plus du méthyl- $\alpha$ -D-glucose, une fraction du milieu avec substrat est prélevée. Le méthyl- $\alpha$ -D-glucose est dissout dans cette fraction qui est ensuite ajoutée au reste du milieu après filtration à 0,2 µm.

Base nutritive tamponnée	Nutriments	Peptone de soja	Fluka 87972	2 g/L
		Extrait de levure	Fluka 70161	2 g/L
	Sels minéraux	Chlorure de sodium (NaCl)	Sigma S5886	5 g/L
		Sulfate de magnésium	Sigma M2643	0,25 g/L
	Tampon pH 6,1	MES, forme acide monohydrate	Fluka 69889	15,99 g/L (75 mmol/L)
		MES, forme basique, sel de sodium	Sigma M3058	16,29 g/L (75 mmol/L)
Substrat osmogène	2-nitrophényl- $\alpha$ -D-glucoside	Carbosynth EN43851	0,301 g/L (1 mmol/L)	
Inducteur	méthyl- $\alpha$ -D-glucose	Sigma 66940	0,412 g/L (2,124 mmol/L)	

**Tableau A.17 : Composition du milieu de culture liquide riche utilisé pour la mise en évidence de l'activité enzymatique  $\alpha$ -glucosidase.**

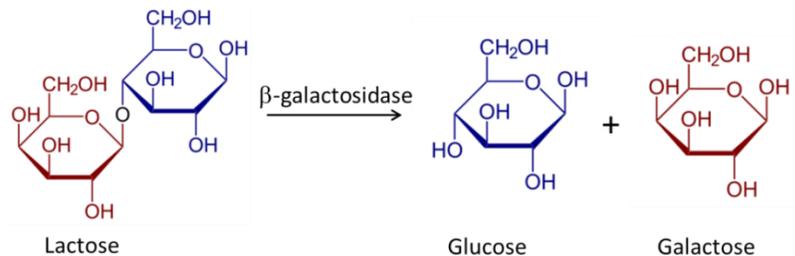
## Annexe 8 : La régulation de la production d'enzymes

Des protéines régulatrices contrôlent l'expression des gènes impliqués dans les processus métaboliques. En se liant à l'ADN au niveau de séquences spécifiques, elles régulent le taux de transcription.

### 8.1-Exemple de l'opéron lactose

Avec l'étude de l'opéron lactose, François Jacob, Jacques Monod et André Lwoff (Prix Nobel de physiologie et médecine en 1965) ont décrit un système de régulation de la transcription des gènes. Ils proposent l'existence de deux classes de gènes qu'ils différencient par leur fonction : les gènes structuraux et les gènes régulateurs.

Les bactéries utilisent les sucres comme source de carbone. Le glucose est la source privilégiée, mais d'autres oses peuvent être métabolisés. C'est le cas du lactose qui peut être métabolisé (en galactose et glucose) par certaines bactéries capables de synthétiser l'enzyme  $\beta$ -galactosidase. Les gènes codant pour cette enzyme sont rassemblés dans l'opéron lactose. [8] [9]



**Figure A.14 : Hydrolyse du lactose en Glucose et Galactose en présence d'enzyme  $\beta$ -galactosidase**

Dans l'opéron lactose, on trouve les trois gènes régulateurs suivants :

- Lac I : un gène en amont de l'opéron lactose qui code pour le répresseur
- Promoteur : une région en amont du site d'initiation de la transcription sur laquelle l'ARN polymérase peut se lier
- Opérateur : une région sur laquelle se fixe un répresseur pour contrôler l'expression d'un gène ou d'un groupe de gènes

Ainsi que trois gènes structuraux indispensables à la dégradation du lactose :

- Lac Z : il code pour la  $\beta$ -galactosidase. Cette enzyme hydrolyse la liaison  $\beta$ -1-4 osidique des  $\beta$ -galactosides (exemple : le lactose)

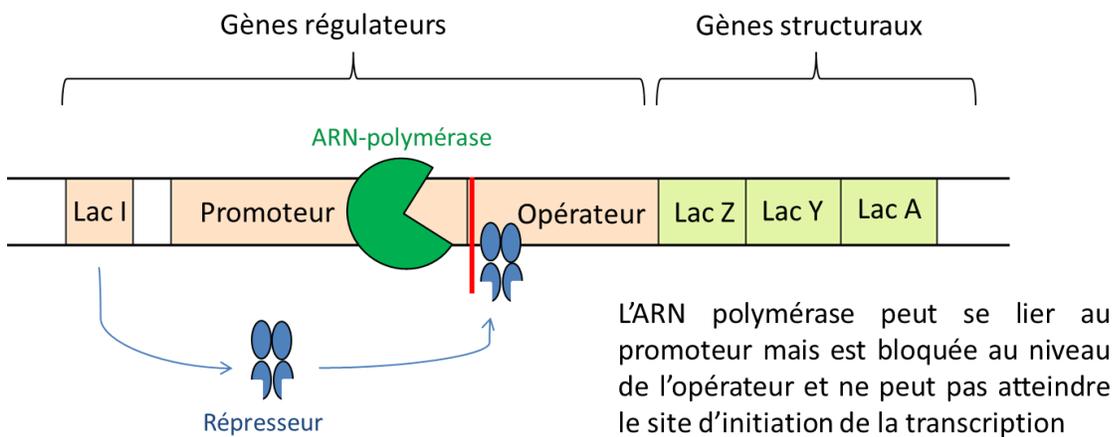
- Lac Y : il code pour la lactose perméase. Cette protéine membranaire permet l'entrée du lactose dans la cellule.
- Lac A : il code pour la thiogalactoside transacétylase. Cette enzyme acétyle les  $\beta$ -galactosides non métabolisables qui sont alors éliminés hors de la cellule.

## 8.2-Régulation négative

Le gène Lac I code pour la fabrication d'un répresseur. En absence de lactose, **ce répresseur se fixe spécifiquement sur l'ADN au niveau de l'opérateur, bloquant ainsi l'accès de l'ARN polymérase au site d'initiation de la transcription.** Il y a donc régulation négative de la transcription des gènes de l'opéron lactose. Les enzymes nécessaires au métabolisme du lactose ne sont pas synthétisées car inutiles en absence de lactose.

En présence de lactose, celui-ci va se lier au répresseur pour l'inactiver. Le répresseur subit alors un changement conformationnel et **perd son affinité pour l'opérateur. L'opérateur est donc libéré** et l'ARN polymérase peut atteindre le site d'initiation de la transcription. La production des enzymes nécessaires au métabolisme du lactose est donc dépendante de la présence du substrat.

### En absence de lactose :



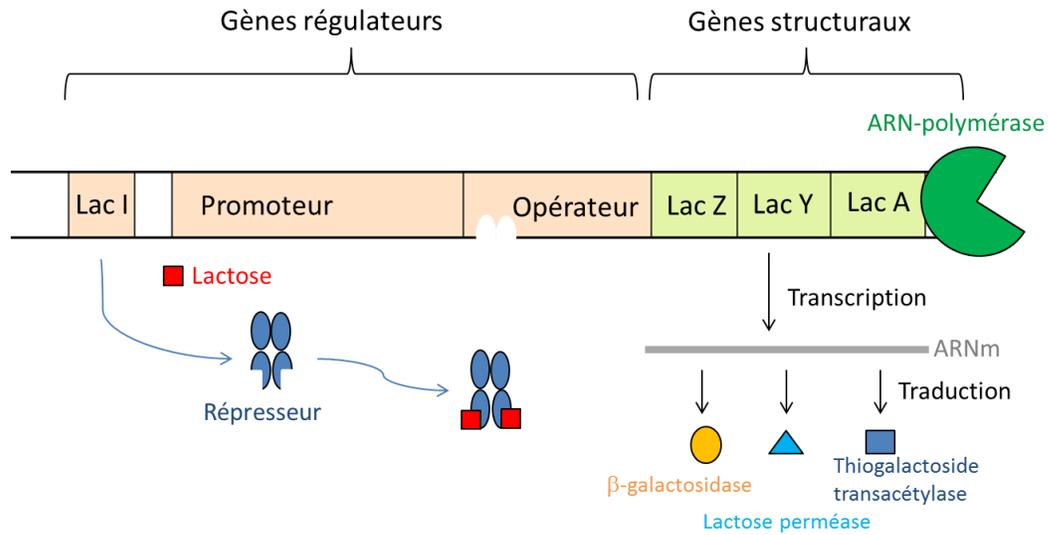
**En présence de lactose :**

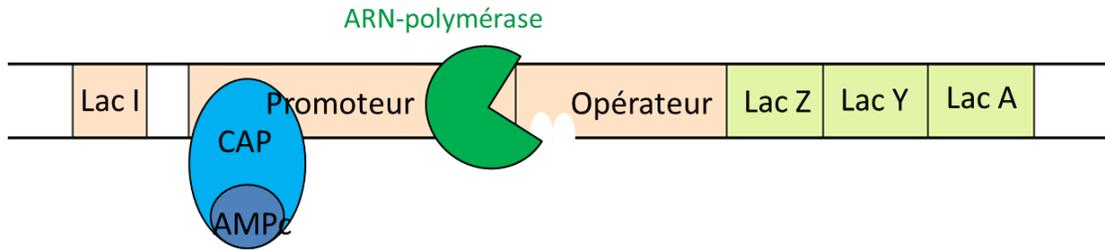
Figure A.15 : Représentation schématique de l'induction de la synthèse d'enzyme la  $\beta$ -galactosidase en présence de lactose.

### 8.3-Régulation positive : la répression catabolique en présence de glucose

La bactérie métabolise préférentiellement le glucose. Donc en présence de ce sucre, elle n'a pas besoin des enzymes qui hydrolysent le lactose.

La présence d'une protéine CAP (Catabolite gene Activator Protein) en amont du promoteur est nécessaire à la fixation de l'ARN polymérase sur le promoteur. La protéine CAP n'a la bonne conformation pour se fixer à l'ADN que si elle est elle-même liée à de l'AMP cyclique. Cette molécule est un messenger signalant une carence alimentaire, produite notamment en absence de glucose pour signaler qu'il faut métaboliser d'autres sources de carbone. Ce qui signifie qu'en absence de glucose, la bactérie va chercher d'autres sources de carbone. De l'AMP cyclique se lie à la protéine CAP qui peut alors se fixer à l'ADN. L'ARN polymérase peut aussi se fixer sur l'ADN et commencer la transcription.

Au contraire, si du glucose est disponible, il n'y a pas d'AMP cyclique pour se lier à la protéine CAP. Celle-ci ne se fixe pas efficacement sur l'ADN et l'ARN polymérase ne démarre pas, ainsi, le lactose n'est pas utilisé comme source de glucose. Ce phénomène est connu sous le nom de répression catabolique.



**Figure A.16 : En absence de glucose, l'interaction entre le complexe CAP-AMPc avec l'ADN permet d'augmenter l'affinité de l'ARN polymérase pour le promoteur de l'opéron. La transcription est alors augmentée.**

## Annexe 9 : Montage pour une mesure d'absorbance en différents points d'un xérogel

Pour rendre compte des hétérogénéités de concentration (d'un COV ou d'une molécule sonde) dans un xérogel, nous avons mis en place un montage qui permet de faire un spectre d'absorbance UV-visible sur une petite zone du xérogel (ici 1 mm x 1 mm).

La lampe utilisée est une lampe halogène/deutérium, une fibre optique amène la lumière au niveau d'une lentille convergente qui focalise le faisceau lumineux sur le xérogel. Une deuxième lentille collecte la lumière transmise, elle est placée de telle sorte que le xérogel soit à son point focal objet, ce qui permet d'obtenir un faisceau collimaté. Enfin, une dernière lentille refocalise le faisceau à l'entrée d'une fibre optique placée à son plan focal image, et cette fibre amène la lumière collectée jusqu'à un spectrophotomètre portable (HR 2000+, Ocean Optics). Une platine mobile munie d'une pince permet de déplacer le monolithe suivant la largeur ou la longueur du xérogel.

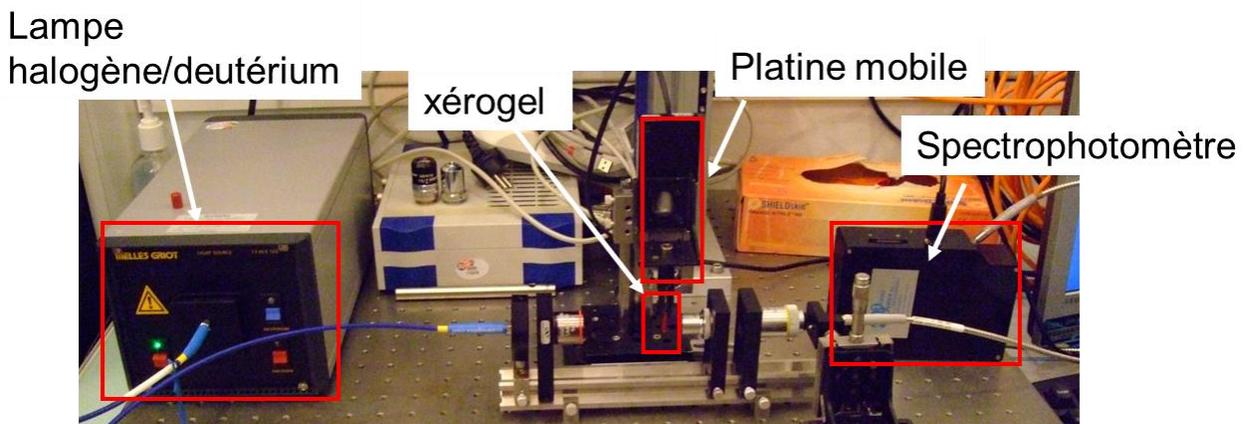


Figure A.17 : Photographie du montage permettant l'étude du profil de concentration dans un xérogel.

Ce montage permet d'obtenir une carte de la concentration en produit dans le xérogel (Figure A.18). Pour estimer la quantité totale de produit azo formé, le volume sous la surface obtenue est calculé. Le volume total sous la courbe est divisé en 20 prismoïdes entre 4 points de mesure. Le volume de chacun de ces prismoïdes correspond au nombre de moles de produit dans cette portion de xérogel (homogène à des mol/m). En multipliant cette concentration par le chemin optique, on obtient le nombre de moles de produit dans cette portion de xérogel. La quantité totale de produit formé est donnée par la somme des quantités contenues dans chaque portion de xérogel :

$$n_{tot} = \sum_1^{20} n_n = 8.10^{-9} \text{ mol.}$$

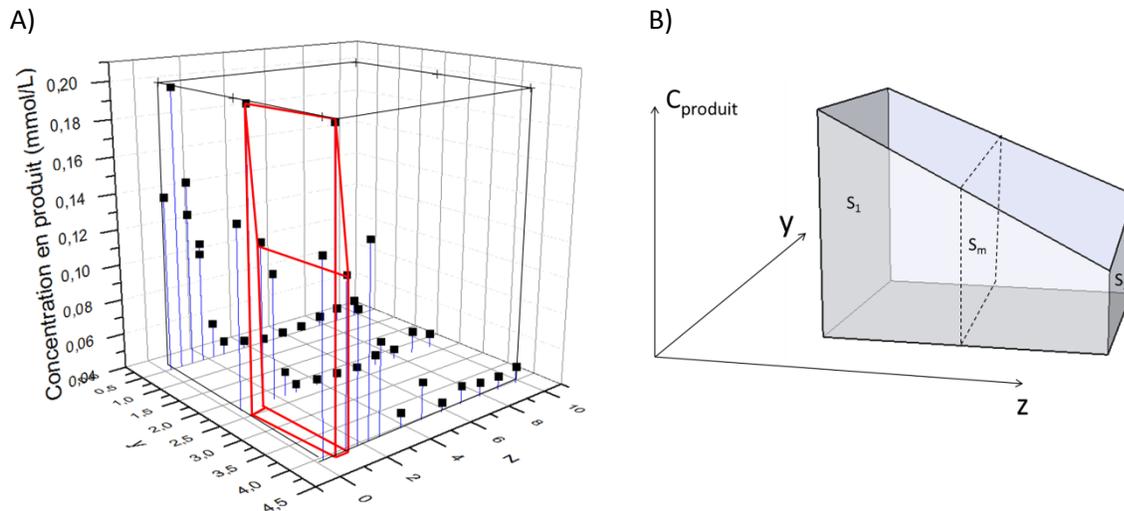


Figure A.18 : Méthode pour l'estimation de la quantité de produit azo formé. A) Profil de concentration en produit azo dans le monolithe 2 mmol/L DMACA-0,5 mol/L HCl exposé à 100 ppm de  $\beta$ -naphthylamine pendant 20 heures. B) Schéma d'un prismoïde. Le plan  $S_m$  est à équidistance de  $S_1$  et  $S_2$  ; le volume est donné par

$$\frac{h}{6}(S_1 + 4S_m + S_2).$$

## Annexe 10 : Détermination des limites de détection

Afin de déterminer les limites de détection de certains appareils de mesure, nous avons utilisé la définition recommandée par la Société Américaine de Chimie (ACS, *American Chemical Society*). [10]

Dans un premier temps, les mesures sont répétées  $k$  fois avec des échantillons sans analyte (« blancs »). Le nombre de mesures  $k$  doit idéalement être d'au moins 7. La valeur moyenne obtenue est notée  $\bar{y}_{blank}$ .

Ensuite,  $k$  mesures sont réalisées sur des échantillons préparés séparément, contenant une quantité d'analyte comprise entre 1 et 5 fois la LOD estimée. L'écart type sur ces mesures est noté  $s_y$ .

Le signal correspondant à la limite de détection est alors calculé de la manière suivante :

$$y_{LOD} = \bar{y}_{blank} + t_{\alpha, k-1} s_y$$

$t_{\alpha, k-1}$  est le quantile de la loi de Student pour  $k-1$  degrés de libertés.  $\alpha - 1$  correspond au niveau de confiance recherché. Par exemple, si on souhaite que la valeur obtenue comme LOD ait 99% de chance d'être supérieure au blanc, alors  $\alpha = 0,01$ .

En poursuivant cet exemple, si  $k = 7$ , alors  $t_{\alpha, k-1} = 3,143$ , alors que si  $k = 10$ ,  $t_{\alpha, k-1} = 2,821$

Pour la suite, nous choisissons comme critère  $\alpha = 0,01$ .

### 10.1-Limite de détection sur le spectrophotomètre Cary 300 (Varian) à 415 nm

Afin de déterminer à partir de quelle valeur la valeur d'absorbance à 415 nm est significative, nous avons effectué 8 mesures du blanc (eau tamponnée avec du MES 0,150 mol/L, pH = 6,1) et 8 mesures sur des solutions de 2-nitrophénol de concentration 2  $\mu\text{mol/L}$  tamponnées (MES 0,150 mol/L, pH = 6,1), préparées séparément. Les valeurs d'absorbance à 415 nm obtenues sont rapportées dans le tableau ci-dessous pour des chemins optique  $L = 1$  cm.

Ainsi, il est possible de calculer la limite de détection de l'appareil à 415 nm, soit la valeur minimale considérée comme significative :

$$y_{LOD} = \bar{y}_{blank} + t_{\alpha, k-1} s_y$$

$$y_{LOD} = 4,9 \cdot 10^{-3}$$

Avec :  $\bar{y}_{blank} = 3,48 \cdot 10^{-4}$ ,  $s_y = 0,00153$  et  $t_{0,01,7} = 2,998$  ( $\alpha=10^{-2}$  et  $k=8$ )

	Blanc : [2-NP] = 0 $\mu\text{mol/L}$	[2-NP] = 2 $\mu\text{M}$
1	$4,0 \cdot 10^{-5}$	0,00953
2	0,00025	0,00872
3	0,00273	0,01257
4	0,00029	0,00700
5	0,00110	0,00837
6	-0,00056	0,00761
7	-0,00039	0,01196
8	-0,00067	0,00877
<b>Moyenne</b>	<b>3,48E-04</b>	<b>9,32E-03</b>
<b>Ecart-type</b>	<b>0,00078</b>	<b>0,00153</b>

Tableau A.18 : Absorbances à 415 nm mesurées sur 8 échantillons « blancs », sans 2-nitrophénol et 8 solutions à 2  $\mu\text{mol/L}$  de 2-nitrophénol.

## 10.2-Limite de détection sur le montage de détection en transmission à travers plusieurs xérogels

De même, nous avons déterminé la limite de détection, c'est-à-dire la valeur absolue de pente minimale qui correspond à l'adsorption de 2-nitrophénol dans les xérogels, pour le montage de lecture en transmission. Ces mesures ont été effectuées avec une superposition de 5 xérogels. Nous avons effectué 5 mesures du blanc (eau tamponnée avec du MES 0,150 mol/L, pH = 6,1) et 5 mesures sur des solutions de 2-nitrophénol de concentration 5  $\mu\text{mol/L}$  tamponnées (MES 0,150 mol/L, pH = 6,1), préparées séparément. Les valeurs des pentes obtenues sont rapportées dans le tableau ci-dessous.

$$y_{LOD} = |\bar{y}_{blank}| + t_{\alpha,k-1} s_y$$

$$y_{LOD} = 3,36 \cdot 10^{-5}$$

Avec :  $\bar{y}_{blank} = -6,76 \cdot 10^{-7}$ ,  $s_y = 8,8 \cdot 10^{-6}$  et  $t_{0,01,4} = 3,747$  ( $\alpha=10^{-2}$  et  $k=5$ )

	Blanc : [2-NP] = 0 $\mu\text{mol/L}$	[2-NP] = 5 $\mu\text{M}$
1	$-3,00.10^{-6}$	$-8,00.10^{-5}$
2	$-3,00.10^{-6}$	$-6,00.10^{-5}$
3	$-8,00.10^{-8}$	$-7,00.10^{-5}$
4	$2,00.10^{-6}$	$-9,00.10^{-5}$
5	$7,00.10^{-7}$	$-8,00.10^{-5}$
<b>Moyenne</b>	<b><math>-6,76.10^{-7}</math></b>	<b><math>-7,60.10^{-5}</math></b>
<b>Ecart-type</b>	<b><math>1,86.10^{-6}</math></b>	<b><math>8,8.10^{-6}</math></b>

Tableau A.19 : pentes mesurées sur 5 échantillons « blancs », sans 2-nitrophénol et 5 solutions à 5  $\mu\text{mol/L}$  de 2-nitrophénol.

## Annexe 11 : Mesure des indices de réfraction

Lorsque que la lumière passe d'un milieu comme l'air à un deuxième milieu d'indice de réfraction plus élevé comme l'eau ou le verre, sa trajectoire est déviée suivant les lois de Snell-Descartes. De ce fait, lorsqu'on regarde un objet sous l'eau depuis l'air, il semble plus proche qu'il ne l'est en réalité.

La réfraction de la lumière est utilisée pour mesurer l'indice de réfraction des xérogels à l'aide d'un microscope Carl Zeiss AX10 avec un objectif Carl Zeiss 10x. Le xérogel dont on souhaite connaître l'indice de réfraction est posé sur une lame de verre. Dans un premier temps, la mise au point est réalisée sur la face supérieure de la lame de verre ( $z_0$ ), puis au niveau de l'image de la lame de verre à travers le xérogel ( $z_1$ ) et enfin sur la surface du xérogel ( $z_2$ ). Trois mesures d'indice sont réalisées par xérogel.

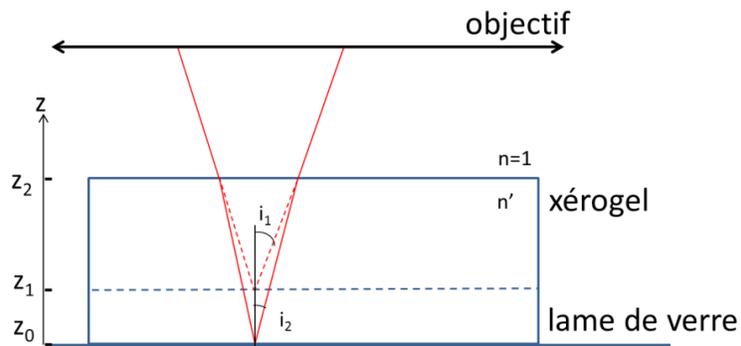


Figure A.19 : schéma de la mesure d'indice optique à l'aide d'un microscope

A partir du schéma (Figure A.19), les relations suivantes sont établies :

$$\tan i_1 = \frac{x}{z_2 - z_1}$$

$$\tan i_2 = \frac{x}{z_2 - z_0}$$

D'après la loi de Descartes (réfraction sur un dioptre plan), on a :

$$n' = \frac{\sin i_1}{\sin i_2}$$

Pour des angles  $i_1$  et  $i_2$  petits, il est possible de développer au premier ordre :

$$\tan i = i + o(i)$$

$$\sin i = i + o(i)$$

Il est alors possible d'exprimer l'indice de réfraction  $n'$  du xérogel en fonction de  $z_0$ ,  $z_1$  et  $z_2$  :

$$n' = \frac{\sin i_1}{\sin i_2} \approx \frac{\tan i_1}{\tan i_2}$$

$$n' = \frac{z_2 - z_0}{z_2 - z_1}$$

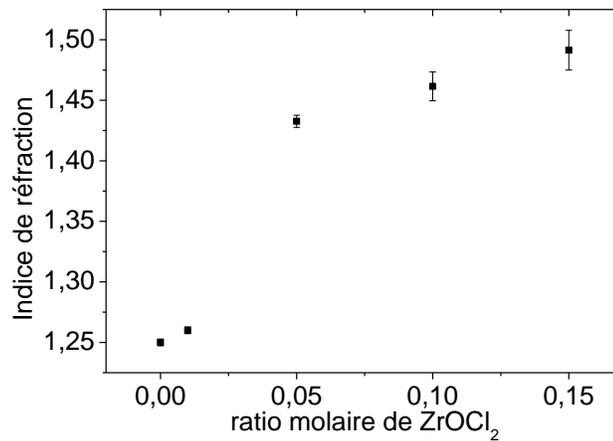
## Annexe 12 : Caractérisations des xérogels mixtes Si-Zr (porosité, indice de réfraction)

Les indices de réfraction des xérogels mixtes Si-Zr obtenus ont été mesurés à l'aide d'un microscope selon le protocole de l'Annexe 11 : trois mesures sont réalisées sur deux xérogels d'une même formulation. Lors des mesures, les xérogels sont en équilibre avec l'atmosphère ambiante du laboratoire (humidité relative 53%, température 22°C)

Les isothermes d'adsorption d'azote ont été établies à 77 K. Les xérogels sont broyés et dégazés pendant 24 heures sous vide à 80°C. Les surfaces spécifiques ont été déduites en utilisant la méthode de Brunauer, Emmet et Teller (BET) et les répartitions de la taille des pores données dans le Tableau A.20 sont déterminées à l'aide de la théorie de la fonctionnelle de densité (DFT).

### 12.1-Xérogels avec oxychlorure de zircon (ZrOCl<sub>2</sub>)

Indices de réfraction :



**Figure A.20 : Indices de réfraction mesurés pour des xérogels contenant différents ratios d'oxychlorure de zircon.**

Porosité (la formulation 0 correspond à celle qui a été retenue au chapitre 4, sans zircon, à savoir : TMOS/MeOH/ABTES/H<sub>2</sub>O = 1/10/0,15/4, séché à 50°C)

Formulation	Ratio molaire de $ZrOCl_2$	Surface BET ( $m^2/g$ )	Volume poreux ( $cm^3/g$ )	Diamètre des pores (Å)
0	0	612	0,395	20-50
2	0,05	116	0,049	15-21
4	0,15	119	0,050	15-20

Tableau A.20 : Surfaces spécifiques, volumes poreux et diamètres de pores mesurés par adsorption-désorption d'azote pour des xérogels contenant différents ratios d'oxychlorure de zircon.

## 12.2-Xérogels avec acétylacétone (acac)

Indices de réfraction :

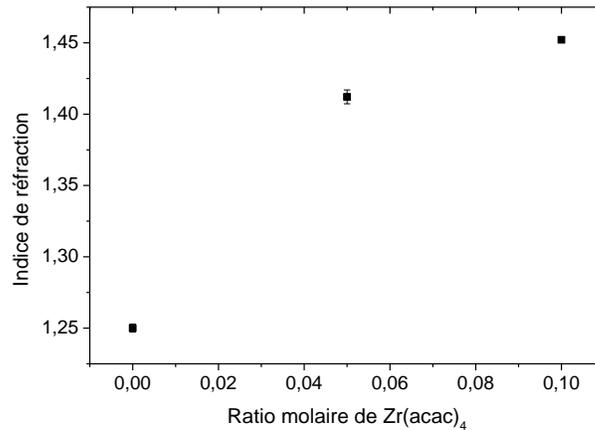


Figure A.21 : Indices de réfraction mesurés pour des xérogels contenant différents ratios d'acétylacétone de zirconium.

Porosité (la formulation 0 correspond à celle qui a été retenue au chapitre 4, sans zircon, à savoir : TMOS/MeOH/ABTES/H<sub>2</sub>O = 1/10/0,15/4, séché à 50°C)

Formulation	Ratio molaire de $Zr(OPr)_4$	Surface BET ( $m^2/g$ )	Volume poreux ( $cm^3/g$ )
0	0	612	0,395
6	0,05	55	0,012
7	0,10	50	0,013

Tableau A.21 : Surfaces spécifiques et volumes poreux mesurés par adsorption-désorption d'azote pour des xérogels contenant différents ratios d'acétylacétone de zirconium.

### 12.3-Xérogels avec acide acétique

Porosité (la formulation 0 correspond à celle qui a été retenue au chapitre 4, sans zircone, à savoir : TMOS/MeOH/ABTES/H<sub>2</sub>O = 1/10/0,15/4, séché à 50°C) :

Formulation	Ratio molaire de Zr(OPr) <sub>4</sub>	Surface BET (m <sup>2</sup> /g)	Volume poreux (cm <sup>3</sup> /g)	Diamètre des pores (Å)
0	0	612	0,395	20-40
10	0,042	523	0,363	20-40
11	0,07	356	0,203	15-40
12	0,14	311	0,171	15-40

**Tableau A.22 : Surfaces spécifiques, volumes poreux et diamètres de pores mesurés par adsorption-désorption d'azote pour des xérogels contenant différents ratios de n-propoxyde de zirconium.**

Les xérogels de formulation 10 à 12 ont un caractère acide du fait de la présence d'acide acétique. Le 2-nitrophénol est alors majoritairement présent sous sa forme moléculaire absorbant à 360 nm. Pour contrebalancer cet effet, le ratio de porogène aminé (ABTES) a été augmenté (formulations 15 à 18) :

Formulation	Ratio molaire d'ABTES	Surface BET (m <sup>2</sup> /g)	Volume poreux (cm <sup>3</sup> /g)	Diamètre des pores (Å)
11	15	356	0,203	15-40
15	20	340	0,223	15-50
16	25	313	0,223	20-60
17	34	233	0,160	20-40

**Tableau A.23 : Surfaces spécifiques, volumes poreux et diamètres de pores mesurés par adsorption-désorption d'azote pour des xérogels mixte Si-Zr contenant différents d'ABTES.**

## 12.4-Xérogels avec 2-méthoxyéthanol

Une solution autre que d'augmenter le ratio d'ABTES est de changer d'agent chélatant : le 2-méthoxyéthanol a été choisi pour remplacer l'acide acétique. R est défini comme le ratio

$$\text{chélatant/métal, i.e. } R = \frac{n_{2-ME}}{n_{Zr(OPr)_4}}.$$

Formulation	Ratio molaire de Zr(OPr) <sub>4</sub>	R	Surface BET (m <sup>2</sup> /g)	Volume poreux (cm <sup>3</sup> /g)	Diamètre des pores (Å)
0	0	/	612	0,395	20-40
22	0,07	14	432	0,309	25-50
23	0,07	28	543	0,294	20-50
24	0,07	70	532	0,325	20-50
25	0,07	140	430	0,240	15-35
26	0,14	14	520	0,348	20-50
27	0,14	70	327	0,243	15-70
29	0,20	14	530	0,327	20-50

**Tableau A.24 : Surfaces spécifiques, volumes poreux et diamètres de pores mesurés par adsorption-désorption d'azote pour des xérogels mixte Si-Zr contenant différents ratio de Zr(OPr)<sub>4</sub> et 2-méthoxyéthanol.**

## Références bibliographiques

- [1] R. Courcol, "Cours de bactériologie générale, <http://www.microbes-edu.org/>." Consulté le 11/08/15.
- [2] J. Staudinger and P. V. Roberts, "A critical compilation of Henry's law constant temperature dependence relations for organic compounds in dilute aqueous solutions," *Chemosphere*, vol. 44, no. 4, pp. 561–576, Aug. 2001.
- [3] R. Sander, "Compilation of Henry's law constants, version 3.99," *Atmospheric Chem. Phys. Discuss.*, vol. 14, no. 21, pp. 29615–30521, Nov. 2014.
- [4] "US National library of medicine, [www.chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/chemidlite.jsp](http://www.chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/chemidlite.jsp)." consulté le 22/04/2015.
- [5] N. Ochiai, K. Sasamoto, A. Hoffmann, and K. Okanoya, "Full evaporation dynamic headspace and gas chromatography-mass spectrometry for uniform enrichment of odor compounds in aqueous samples," *J. Chromatogr. A*, vol. 1240, pp. 59–68, Jun. 2012.
- [6] J. Rouquerol, F. Rouquerol, P. Llewellyn, G. Maurin, and K. S. W. Sing, *Adsorption by Powders and Porous Solids: Principles, Methodology and Applications*. Academic Press, 2013.
- [7] L.-H. Guillemot, "Capteurs chimiques à base de matrices synthétisées par voie sol-gel et à transduction optique pour la détection de composés organiques volatils microbiens (mCOV)," Thèse de doctorat, Université Paris-Sud, soutenue le 19/10/2012.
- [8] I. Borde, "La régulation de l'opéron lactose, <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/operonlactose/>." Consulté le 11/08/15.
- [9] J. Pelmont, "Des protéines à l'ADN," in *Enzymes: catalyseurs du monde vivant*, Edp Sciences., 1996, pp. 159–168.
- [10] H.-P. Looock and P. D. Wentzell, "Detection limits of chemical sensors: Applications and misapplications," *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 173, pp. 157–163, Oct. 2012.

