Nez artificiel à transduction optique à base de matériaux sol-gel nanoporeux.

Emilie Perret

▶ **To cite this version:**

Emilie Perret. Nez artificiel à transduction optique à base de matériaux sol-gel nanoporeux.. Autre. Université Grenoble Alpes, 2017. Français. NNT : 2017GREAS056 . tel-01968755

HAL Id: tel-01968755
https://theses.hal.science/tel-01968755

Submitted on 3 Jan 2019

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.

Communauté
UNIVERSITÉ Grenoble Alpes

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE LA COMMUNAUTE UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Spécialité : **BIS - Biotechnologie, instrumentation, signal et imagerie pour la biologie, la médecine et l'environnement**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

« Emilie PERRET »

Thèse dirigée par **Pierre MARCOUX (EDISCE),** habilitation ponctuelle obtenue en 2014 pour E.Perret, CEA, et codirigée par **Pascal MAILLEY**, Ingénieur de recherche CEA,
préparée au sein **du Laboratoire CEA Grenoble-LETI-DTBS-SBSC-LCMI**
dans l'**École Doctorale Ingénierie pour la santé la Cognition et l'Environnement**

Nez artificiel à transduction optique à base de matériaux sol-gel nanoporeux.

Artificial nose with optical transduction based sol-gel nanoporous technology.

Thèse soutenue publiquement le **13 Décembre 2017 »**,
devant le jury composé de :

Madame MARIE-HELENE DELVILLE
DIRECTRICE DE RECHERCHE, CNRS DELEGATION AQUITAINE, Rapporteur
Monsieur STEPHANE PAROLA
PROFESSEUR, UNIVERSITE LYON 1, Rapporteur
Monsieur DAVID GROSSO
PROFESSEUR, UNIVERSITE AIX-MARSEILLE, Président
Madame SABINE CRUNAIRE
INGENIEUR DE RECHERCHE, IMT - LILLE DOUAI, Examinateur
Monsieur ARNAUD BUHOT
INGENIEUR DE RECHERCHE, CEA GRENOBLE, Examinateur
Monsieur PIERRE MARCOUX
INGENIEUR DE RECHERCHE, CEA GRENOBLE, Directeur de thèse
Monsieur PASCAL MAILLEY
DIRECTEUR DE RECHERCHE, CEA GRENOBLE, Co-directeur de thèse

Remerciements

Il est des sports individuels qui sont très collectifs. La plongée souterraine en est un bon exemple. Le plongeur de pointe demeure le seul à aller au bout du projet, mais sans le soutien et le travail des plongeurs relayeurs, poseurs de bouteilles d'air, l'objectif final ne peut être atteint. Une thèse est un projet comparable. Il n'est possible de la mener à bien que grâce aux échanges et aux multiples discussions qui permettent au doctorant d'apprendre et de se questionner pour progresser. C'est une aventure humaine et formatrice.

Je remercie **Pierre Marcoux**, directeur de cette thèse, de m'avoir donné l'opportunité de travailler sur ce projet pluridisciplinaire et de m'avoir fait découvrir le monde passionnant des bactéries. Je tiens aussi à exprimer toute ma gratitude à **Pascal Mailley**, co-directeur de thèse, pour sa disponibilité, son investissement et son exceptionnel implication.

Je tiens également à remercier mes rapporteurs : **Marie-Hélène Delville**, directrice de recherche au CNRS pour sa relecture complète et attentive, **Stéphane Parola**, pour les discussions que nous avons eues autour des caractérisations RMN qui ont été très enrichissantes.

J'adresse également mes tous remerciements à **David Grosso**, professeur à l'université d'Aix-Marseille ainsi qu'à la Chaire d'excellence Amidex, **Sabine Crunaire**, ingénieur de recherche aux Mines de Douai, et avant-gardiste de la détection des bactéries *via* les matériaux sol-gels et **Arnaud Buhot** ingénieur de recherche au CEA Grenoble.

Je remercie les chefs successifs du Laboratoire de Chimie des Matériaux et Interfaces (LCMI), **Gilles Marchand**, **Pascal Mailley** et **Séverine Vignoud** de m'avoir accueillie au sein de leur laboratoire, ainsi que l'ensemble des membres du LCMI. Je pense, plus particulièrement, à celles et ceux qui m'ont formée et guidée : **Marjorie Vrignaux**, **Arnaud Lemelle** et **Guillaume Costa**. Merci aussi à **Marie Escudé**, reine de la travée

105, pour son écoute et sa bonne humeur. Je n'oublierai pas **Brunelle Archambeaud**, ma fantastique stagiaire, motivée et motivante à qui je souhaite de très belles aventures de thèse ! Je remercie, pour leur aide précieuse en caractérisation, **Arnaud de Geyer** pour toutes ses connaissances partagées en diffusion des rayons X aux petits angles et **Séverine Vignoud** de m'avoir permis de réaliser des analyses BET. Enfin, je remercie l'ensemble des personnes croisées aux détours d'une manip ou d'une discussion, pour leurs conseils et astuces !

Il y a aussi des coups de pouce inattendus : Merci à **Sœur Anne-Laetitia**, rencontrée au hasard d'un co-voiturage et relectrice d'un jour.

Ces trois années grenobloises m'ont apporté de belles rencontres, qui ont su transformer les moments de doute en belles rigolades ou bonnes glaces ! Merci à mes co-bureau **Morgane**, et **Eloïse**. Merci à **Julien**, maître jedi, à **Clémentine** et **Mathilde** padawan en devenir, à la team **ElectroChoc** – **Gaetan S.**, **Julie**, **Gaétan G.** et **Mélanie** – à **Thomas**, **Vivian**, **David**, **Roxane**, **Charlotte**, **Valentin Chalore**, **Etzael**. Merci encore au CBPiens de Grenoble, **Benjamin**, **Philippe**, **Clara** et **Florian**.

Il y aussi les amis de longues dates, toujours présents : **Aurélie**, **Margaux**, **Mickael**, mention spéciale à **Isabelle**, merci à toi !

Merci à **mes parents** et **ma sœur** pour les échappées cyclistes et leur soutien indéfectible quand ça déraille. (On a toujours besoin de mécano, de directeur sportif et d'une équipe logistique hors pair).

Rémi, merci à toi, d'être là, et de nous emmener nous perdre dans la nature sur et sous terre. Tu as attaqué la cordée, je te rattrape !

Résumé

Dans les domaines de la microbiologie industrielle et clinique, la détection des micro-organismes *via* la fraction volatile du métabolome suscite un intérêt croissant. En effet l'analyse en phase gaz est non-invasive et permet le contrôle de milieux complexes comme les matrices alimentaires et les échantillons sanguins. La détection de ces Composés Organiques Volatils (COV) microbiens est effectuée *via* leur capture grâce à des matériaux nanoporeux à grande surface spécifique préparés par voie sol-gel (xérogels). Par une capture non spécifique des COV, ces matériaux concentrent l'analyte et permettent une détection optique des COV microbiens.

Trois approches ont été suivies. D'une part une approche ambitieuse et novatrice a été étudiée, *via* l'analyse du profil olfactif global d'un échantillon. Dans ce cas les xérogels sont dopés avec des sondes moléculaires à faible spécificité, le but étant de concevoir un nez artificiel capable de caractériser un très grand nombre de gaz ou de mélanges gazeux. Ces sondes font appel à des interactions non covalentes de type acide-base de Lewis, acide-base de Brönstedt, réactions rédox ou interactions dipolaires. La faisabilité de cette méthodologie vis-à-vis de l'acquisition des signatures de différents pathogènes (afin d'établir une base de données pour l'identification ultérieure d'une culture inconnue) a été étudiée selon deux modes de transduction : absorbance et fluorescence. D'autre part, la détection ciblée de COV d'intérêt *via* des capteurs spécifiques a été considérée. Le matériau est alors doté d'une molécule sonde réagissant spécifiquement avec un COV cible, de manière à former *in situ* un composé absorbant fortement dans l'UV-visible et assurant la transduction optique. Enfin, cette méthode a été associée à une troisième méthodologie mettant en œuvre des activités enzymatiques propres aux bactéries. Pour ce faire, un substrat ajouté dans le milieu de culture est enzymatiquement clivé par les bactéries, libérant ainsi un COV d'intérêt facilement détectable par transduction optique. Pour mieux en comprendre les limites, cette technique a été mise en œuvre pour trois pathogènes d'intérêt *E.coli*, *S.aureus* et *Salmonella* dans des matrices alimentaires complexes.

Abstract

In the fields of industrial and clinical microbiology, the detection of microorganisms through the emission of volatile metabolites rises unprecedented interest. Indeed, since volatile metabolites detection is effected in gas phase, this noninvasive methodology can be implemented for the control of complex samples such as food matrices and blood samples. Xerogels (Nanoporous materials produced using a sol-gel process) are used here to capture these microbial Volatile Organic Compounds (VOC) thanks to their nanoporosity and large and chemically tailored specific surface. These xerogel properties yield efficient accumulation and capture of the bacterial VOC. Furthermore, the intrinsic optical transparency of these materials allows a spectroscopy-based detection.

Three approaches have been studied. First, an ambitious and innovative approach was considered, based on the analysis of the global olfactory profile emitted by bacteria. The objective was to design an artificial opto-chemical nose that allows to characterize an important number of gases and further complex gas mixtures. For this purpose, arrays of xerogels were modified through the incorporation of non-specific molecular probes that enable optical transduction of VOC, through a range of low energy chemical interactions including Lewis and Brönstedt interactions, redox reactions and dipolar coupling. In presence of bacterial VOC emission, the xerogel array will generate a complex optical-response pattern (fluorescence and absorbance responses) that may be bacteria-specific. The feasibility study of this approach was done on a range of artificial VOC and on real bacterial metabolites. Secondly, targeted detection of VOC of interest *via* specific sensors was considered. Conversely to the first approach, xerogel incorporate here molecular probes that specifically react *in situ* with targeted VOC to form a colored compound providing optical transduction. Finally this method was coupled with a third detection methodology based on bacteria enzymatic pathways. Thus, enzymatic substrates are added to culture media and are specifically cleaved by bacterial enzymes, so as to generate selected VOC that provide convenient optical detection. In order to better understand the limits of these latter methodologies, their ability at detecting bacteria was stressed on three common pathogens *E.coli*, *S.aureus* and *Salmonella*, in complex food matrices.

Table des matières

Remerciements **3**

Résumé **5**

Abréviations **11**

Introduction générale **13**

I Méthodes de détection et d'identification des bactéries et contexte de la thèse **15**

I.1 Avant-propos : Les bactéries et les enjeux de leur détection. 15

I.2 Méthodes standards 16

I.2.1 Détection biochimique 16

I.2.2 Détection immunologique 17

I.2.3 Détection génétique 18

I.3 Les nouvelles méthodes de détection et les axes de développement 18

I.3.1 Détection directe 19

I.3.2 Détection de la fraction volatile 20

I.4 Présentation du sujet de thèse dans le contexte des travaux menés au sein du CEA-Leti 24

I.4.1 Matériaux sol-gels 25

I.4.2 Détection de métabolites microbiens *via* des sol-gel méso-poreux . . 27

I.4.3 Déroulement des travaux 30

II Formulations et caractérisations des xérogels **33**

II.1 Études et sélections préliminaires des matériaux sol-gels 33

II.1.1 Modèle et méthodologie 33

II.1.2 Influence de la nature du silane fonctionnalisé 35

II.1.3 Le pH intra-pores des xérogels 40

II.1.4 Diffusion des COV au sein de matériau sol-gel 46
II.1.5 Développement de formulations éthanoliques 48
II.2 Caractérisation des xérogels par diffusion des rayons X aux petits angles . 48
II.2.1 Quelques notions de SAXS 49
II.2.2 Analyses de formulations TMOS et TEOS sans précurseur fonctionnalisé 52
II.2.3 Analyses de formulations TMOS et TEOS contenant un précurseur fonctionnalisé 56
II.2.4 Conclusion sur les analyses par SAXS 59
II.3 Introduction d'une molécule sonde au sein de capteurs TEOS pour la détection des composés soufrés volatils (CSV) 60
II.3.1 Pourquoi détecter des CSV ? 60
II.3.2 Réaction sonde-cible 61
II.3.3 Les capteurs TMOS existants 62
II.3.4 Mise en place de formulations TEOS 62
II.3.5 Résultats 64
II.3.6 Conclusions et perspectives sur la détection de CVS *via* des formulations TEOS 64
II.4 Conclusion et perceptives 64

III Analyse du profil olfactif formé par les COV endogènes des bactéries 67
III.1 Approche Nez électronique 68
III.1.1 L'idée de nez artificiel 68
III.1.2 L'Analyse en composantes principales (PCA : Principal Component Analysis) 69
III.1.3 Analyse par spectroscopie d'absorbance et colorimétrie 73
III.2 Analyse matricielle par spectroscopie de fluorescence 97
III.2.1 Analyse des matériaux de référence pour le spectromètre de fluorescence 97
III.2.2 Mise en place de formulations pour la détection par spectrométrie de fluorescence 98
III.2.3 Étude de COV générés chimiquement 104
III.3 Conclusion sur l'analyse d'un profil olfactif bactérien global 109

IV Détection multiparamétrique à partir de COV ciblés **111**

IV.1 Sélection des COV cibles et des modes de transductions liés 111

IV.2 Détection en absorbance avec sondes spécifiques : cas de la détection de l'indole 113

IV.2.1 Les réactions sondes-cibles 114

IV.2.2 Formulation DMACA TFA 116

IV.2.3 Renforcement de la tenue mécanique des matériaux 122

IV.3 Détection sans sonde de COV endogènes 128

IV.3.1 Rappel sur la détection avec sonde spécifique de l'indole 128

IV.3.2 Détection de l'indole en absorbance sans sonde 129

IV.3.3 Détection de l'indole en fluorescence sans sonde 135

IV.4 Détection sans sonde de COV exogènes 138

IV.4.1 Les voies enzymatiques spécifiques mises en place 138

IV.4.2 Impact d'une matrice alimentaire grasse sur la détection de COV : exemple de la mousse au chocolat 141

IV.4.3 Détection de *Staphylococcus aureus via* l'activité enzymatique α-glucosidase 142

IV.4.4 Détection de *Salmonella via* les activités enzymatiques C8-Estérase et thiosulfate réductase 145

IV.4.5 Détection de *E.coli* et des *Coliformes* 146

IV.5 Détection multi-capteurs 154

IV.5.1 Conclusion et perspectives 157

IV.6 Conclusion sur la détection de COV ciblés pour l'identification de pathogènes 158

Conclusion générale **161**

A Compléments expérimentaux **167**

A.1 Chapitre II 167

A.1.1 Formulations 167

A.1.2 Protocoles de détermination des limites de détections de l'indole et le 2-nitrophénol 168

A.1.3 Etude des matrices nanoporeuses de silice par diffusion de rayons X aux petits angles (SAXS), adsorption-désorption azote et RMN du silicium 170

A.1.4 Xérogels TEOS-DTNB pour la capture de composés volatils soufrés 175

A.2 Chapitre III 179
A.2.1 Mise en place de formulation pour la fluorescence 179
A.2.2 Préparation des suspensions bactériennes 183
A.3 Chapitre IV 183
A.3.1 Détection d'un COV endogène d'*E.coli* : l'indole 183
A.3.2 Détection de COV exogènes 189
A.3.3 Instrumentation d'un sac d'homogénéisation 192

B Concentration en phase gazeuse **193**
B.1 Loi et constante de Henry 193
B.2 Concentrations dans la phase gazeuse à l'équilibre 195

C Quelques notions de microbiologie **199**
C.1 Taxonomie 199
C.2 Distinction Gram+/Gram- 200

D Méthode du nombre le plus probable et tables de McGrady **203**

E Produits réactionnels **207**
E.1 Produits réactionnels 207
E.2 Souches bactériennes 209

Références bibliographiques **211**

Abréviations

ABTES	4-aminobutyltriéthoxysilane
ADN	Acide désoxyribonucléique
α-GLU-2-NP	Substrat enzymatique 2-nitrophényl-α-glucopyranoside
APTES	3-aminopropyltriéthoxysilane
APhTMS	p-aminophenyltrimethoxysilane
ARN	Acide ribonucléique
ATCC	American Type Culture Collection
BET	Méthode de Brunauer, Emett et Teller pour la détermination de la surface spécifique
β-GUR-2-NP	Substrat enzymatique 2-nitrophényl-β-D-glucuronide
BJH	Modèle Barrett, Joyner et Halenda
β-NA	β-naphthylamine
COS	Gélose Columbia + sang de mouton
COV	Composé Organique Volatil
CSV	Composé Volatil Soufré
Cfu	Unité formant colonie
C8-2-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 Peptonée Tamponnée
EtOH	Ethanol
FID	Détecteur à ionisation de flamme
FTMOS	trimethoxy(3,3,3-trifluoropropyl)silane
Hcc	Constante de Henry
HEAPTES	n,n-bis(2-hydroxyéthyl)-3-aminopropyltriéthoxysilane
IMS	Ion Mass Spectrometry, spectrométrie de masse à ionisation
MALDI-TOF MS	Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry

MeOH	Méthanol
MES	Acide 2-(N-morpholino)éthanesulfonique
MRSA	Methicilin Resistant Staphylococcus aureus
3MPTMS	3-methoxypropyltrimethoxysilane
MS	spectrométrie de masse
N-butyl	n-butyltrimethoxysilane
no	Nombre d'oxydation
2-NP	2-nitrophénol
4-NP	4-nitrophénol
NTCC	National Collection of Type Cultures
ODTES	n-octadecyltrimethoxysilane
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDMS	Polydiméthylsiloxane
PhTMOS	p-aminophenyltrimethoxysilane
ppb	Partie par billion
ppm	Partie par million
SA	Staphylococcus aureus
SAXS	Small Angle X-rays Scattering, la diffusion des rayons X aux petits angles
SDS	Laurylsulfate de sodium
SPR	Résonnance plasmonique de surface
TEOS	Tetraethyl orthosilicate
TMOS	Tétraméthylorthosilicate
TNB	Acide 2-nitro-5-thiobenzoïque
TSA	Tryptic Soy Agar, gélose trypticase soja
TMSP	3-acetoxypropyltrimethoxysilane
TMSPA	(3-acetamidopropyl)trimethoxysilane
TMSPT	3-mercaptopropyltrimethoxysilane
Ufc	Unité Formant Colonie
UV	Ultra-violet

Introduction générale

En France en 2015, près de 1 400 Toxi-Infections Alimentaires Collectives (TIAC) ont été répertoriées. Les agents pathogènes les plus fréquents sont *Salmonella* (48%) *Bacillus cereus* (10%) , *Campylobacter* (8%) et *Staphylococcus aureus* (7%).[1] Le marché de l'analyse sanitaire est donc un acteur majeur de l'industrie agroalimentaire. Ce secteur doit sa croissance à une réglementation de plus en plus stricte. Déjà bien implantées en occident, les normes sont, par exemple, particulièrement drastiques au Canada vis-à-vis d'aliments importés, les notions de sécurité et de contrôles sanitaires des denrées alimentaires sont en pleine expansion dans un pays tel la Chine qui connait dans ce domaine une prise de conscience importante depuis les années 2000. [1] Ainsi,l'analyse de E.C. Alocilja & al., en 2003, répertoriait 144 millions de tests microbiologiques pour l'industrie agroalimentaire américaine en 2000 soit un marché de 192 millions de dollars. [2] La méthode microbiologique standard, illustrée figure 1 par la détection de *Salmonella* selon le protocole ISO 6579 (2002), est chronophage ; en effet, elle demande 4 à 5 jours. [3] Or, afin d'identifier les contaminations au plus vite pour éviter les coûts de rappel des produits (le rappel de 20 tonnes de steaks hachés suite à une suspicion de bactérie *E.coli* aura couté 500 000 € à la société Spanghero, en 2011), les industries alimentaires ont besoin de méthodes rapides et efficaces.

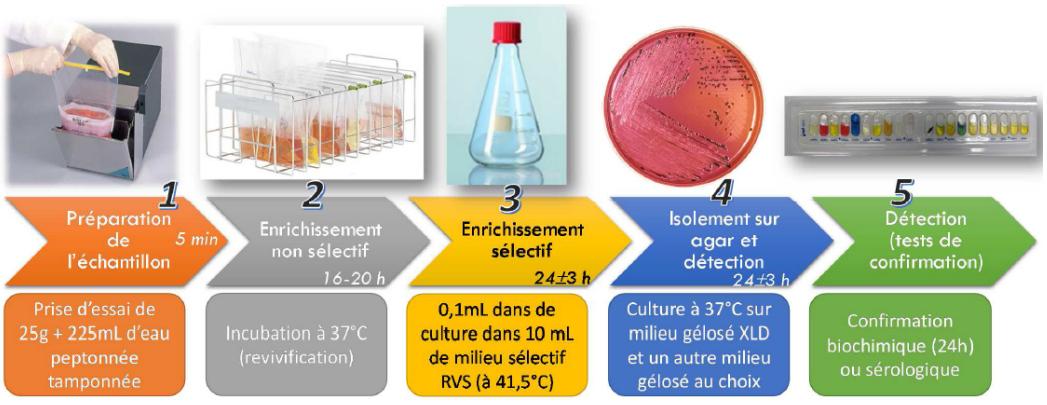


Fig. 1 – **Détection spécifique de *Salmonella*** (protocole ISO 6579,2002). **Etape 1** : Homogénéisation afin de décoller un maximum de bactéries de la matrice alimentaire pour les faire passer en phase liquide où elles pousseront mieux. **Etape 2 :** Enrichissement non sélectif visant à accroitre la charge bactérienne. **Etape 3 :** Enrichissement sélectif pour sélectionner l'agent pathogène ciblé. **Etape 4 :** Isolement pour identifier *Salmonella* (colonies rouges à centre noir). **Etape 5 :** Tests de confirmation. [4]

C'est, dans ce contexte de demande de capteurs rapides, sensibles, faciles d'utilisation et bas coûts, que s'inscrivent ces travaux de thèse.

Les agents pathogènes se caractérisent par un métabolome [1]qui leur est propre. [5] Parmi les métabolites qu'ils émettent une partie est volatile. L'analyse de cette fraction volatile est particulièrement intéressante puisqu'elle permet de s'affranchir de la complexité de la matrice. Par ailleurs, il est fortement avantageux de développer des méthodes de détection au cours des étapes d'enrichissement. Dans le cadre de ce projet, l'axe de développement vise à la mise au point d'un ensemble de capteurs de composés organiques volatils (COV) à transduction optique (absorbance ou fluorescence) alliant efficacité, bas coût et facilité d'usage. Les capteurs sont synthétisés par voie sol-gel afin d'obtenir des matrices nanoporeuses [2] (xérogels). [6] [7] [8] La grande surface développée de ces matériaux permet une adsorption et une accumulation non spécifique des COV. La transduction optique mise en place, *via* une éventuelle molécule chimiosensible, permet d'obtenir la sélectivité.

L'objectif est d'étudier de nouveaux modes de transductions optiques. Pour ce faire, les travaux ont pris en compte aussi bien des aspects amont comme la formulation chimique de matériaux, que des aspects plus applicatifs comme l'instrumentation et la mise en forme.

Le chapitre I est consacré à l'état de l'art tant sur la thématique de la détection microbienne que sur celle des matériaux sol-gel.

Le chapitre II s'attache à la caractérisation des matériaux poreux et la mise en place de caractérisations par diffusion des rayons X aux petits angles.

Les chapitres III et IV proposent deux stratégies de détections.

Le chapitre III étudie l'analyse du profil olfactif global formé par les métabolites bactériens suivant deux modes de transduction optique : nez artificiel en absorbance et Matrice d'Excitation-Emission (EEM) en fluorescence. Le chapitre IV présente une analyse ciblée de COV microbiens *via* l'usage de réactions sonde-cible spécifiques ou la mise à profit de voies enzymatiques spécifiques.

La méthodologie globale de ces travaux a consisté à tester les différents modes de transduction d'abord sur des composés chimiques modèles puis sur des milieux microbiologiques de plus en plus complexes s'approchant des normes en usage pour l'industrie agroalimentaire.

1. Le métabolome correspond à l'ensemble des métabolites produits par un organisme vivant au cours son cycle de développement.
2. Le terme nanoporeux regroupe ceux de micro- et méso-poreux.

Chapitre I

Méthodes de détection et d'identification des bactéries et contexte de la thèse

I.1 Avant-propos : Les bactéries et les enjeux de leur détection.

La détection et l'identification des agents pathogènes microbiens sont des enjeux majeurs de la santé publique que ce soit dans les domaines de la microbiologie clinique ou de l'agroalimentaire. [1] [9] En milieu clinique, il s'agit de traiter le plus rapidement possible un patient avec un traitement adapté. Or les méthodes conventionnelles prennent plusieurs jours pour identifier l'agent pathogène. De fait le patient est d'abord traité avec des antibiotiques à large spectre avant de pourvoir bénéficier d'un traitement ciblé. En milieu agro-alimentaire, la notion de temps est primordiale. En effet, les produits sont généralement commercialisés avant l'obtention des résultats de tests bactériologiques - en particulier les produits frais. Cela entraine un risque sanitaire et le cas échéant des frais de rappel du produit. Réduire le temps d'analyse présente donc un intérêt majeur, dans le milieu médical, pour traiter au plus vite et de manière plus pertinente l'infection, et dans l'industrie alimentaire pour d'une part libérer les lots plus rapidement et pour, d'autre part, éviter l'analyse complète sur les lots négatifs.

Ce chapitre bibliographique débute par une présentation non-exhaustive des méthodes standards d'analyse microbiologique. Cependant ces méthodes, consacrées dans l'industrie et le monde clinique, ne répondent pas totalement à des cahiers des charges exigeants : faible temps de détection, mise en œuvre simple et peu coûteuse, matériel transportable, etc. Nous présenterons donc ensuite des méthodes alternatives proposant des améliorations vis-à-vis d'une ou plusieurs attentes de ce cahier des charges.

Les méthodes d'analyse sont ici classées selon leur stratégie de détection. Il est en

effet possible de détecter les bactéries directement (*via* des méthodes physiques ou biochimiques) ou indirectement (*via* les métabolites émis durant leur croissance). Afin de gagner en temps et en coût, ces méthodes ont été automatisées.

I.2 Méthodes standards

La méthode standard de détection puis d'identification des pathogènes en agroalimentaire se base sur les propriétés de croissance des micro-organismes. Le protocole se décompose en plusieurs étapes successives entre la prise d'essai et les résultats qui peuvent intervenir jusqu'à 48 h après les débuts des contrôles microbiologiques. La première phase est constituée d'une étape de croissance non sélective 16 h à 20 h, nécessaire pour augmenter la biomasse. S'en suivent des étapes de croissance sélective, d'isolement et d'identification, il faut le plus souvent un délai minimum de 48 h pour obtenir des résultats significatifs.

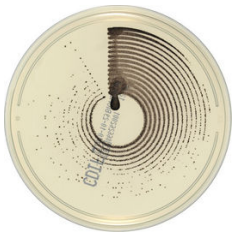
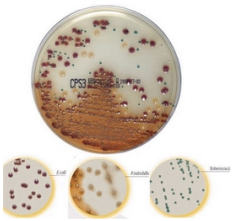
Il est important de distinguer la détection de l'identification. La première stratégie recherche la présence des agents pathogènes de manière plus ou moins ciblée, tandis que la seconde permet d'identifier le ou les agents pathogènes détectés en comparant un ensemble de caractéristiques (morphologiques, génétique ou protéomiques) à une base de données. En cas de détection, une étape d'identification est réalisée.

Les différents modes d'analyse, employés dans le cadre d'un protocole standard, peuvent être classés en trois groupes selon la nature de ce qui est détecté. Le premier mode d'analyse est basé sur la croissance des agents pathogènes selon leur biochimie. Une deuxième approche consiste à détecter un agent pathogène *via* son interaction avec une particule immunogène. Enfin, le troisième mode qui tend à devenir prédominant en agroalimentaire est basé sur les réactions d'amplification génique de type PCR (polymerase chain reaction) qui amplifient l'ADN bactérien pour permettre son identification.

I.2.1 Détection biochimique

Les galeries biochimiques nécessitent une étape de culture préalable. Pour réduire le temps de détection, on favorise généralement des milieux chromogéniques qui permettent à la culture et au test biochimique de se dérouler simultanément. [10]

Ces milieux chromogéniques se présentent sous la forme de boîtes de Pétri contenant des substrats chromogènes commerciaux. Le tableau I.1 en donne trois exemples. La dégradation de substrats par l'agent pathogène se traduit par une modification de couleur et témoigne d'une voie enzymatique spécifique d'une bactérie ou d'une famille de bactéries.

		
ChromID C.Difficile Clostridium (*bioMrieux*)	*CPSID3* (*bioMrieux*)	CHROMagar^{TM} *S.aureus* (*BectonDickinson*)

Tab. I.1 – Milieux chromogènes commerciaux pour l'identification de pathogènes. La dégradation de substrats enzymatiques par l'agent pathogène entraine un changement de couleur spécifique permettant l'identification d'une bactérie ou d'une famille de bactéries

I.2.2 Détection immunologique

La détection immunologique est basée sur la capture d'antigènes par des anticorps. Ce mode de détection est efficace à deux échelles : il peut cibler les antigènes portés par les bactéries mais aussi ceux portés par leurs toxines libérées au sein de l'échantillon. [11]. La transduction qui révèle la capture de l'antigène par un anticorps peut être de nature diverse :

- agglutination [12] [13]
- précipitation [14]
- spérartion par capture sur bandelette [15]
- Méthodes immuno-enzymatiques telles que le test ELISA (Figure I.1) qui a pu être automatisé *via* plusieurs automates commerciaux : VIDAS ® et Mini-VIDAS ® (bioMerieux), Tecra Salmonella ELISA (International Bioproducts), et Salmonella Tek ELISA (Organon Teknika) [15]

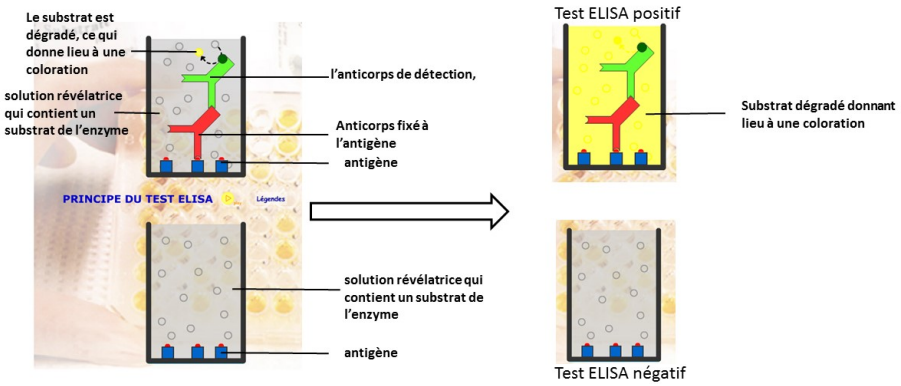


Fig. I.1 – **Principe du test ELISA :** Le complexe antigène-anticorps est détecté par l'ajout d'un second anticorps spécifique dit de détection. Un complexe "sandwich" à deux anticorps est alors formé. Ce composé est rélévé par ajout d'un substrat enzymatique.

I.2.3 Détection génétique

La détection des agents pathogènes *via* leur ADN est une alternative qui s'est considérablement développée car cette méthode est plus spécifique, plus sensible et surtout beaucoup plus rapide. Cette méthode se décompose en plusieurs étapes : il s'agit tout d'abord d'amplifier la biomasse afin d'obtenir quelques millilitres de suspension à 10^3 ucf.mL^{-1}. S'en suivent des étapes de lyse des cellules, d'extraction et de réplication de l'ADN. L'amplification de l'ADN est le plus souvent réalisée par PCR conventionnelle. En effet, cette méthode permet de dupliquer de façon exponentielle les séquences d'ADN d'intérêt. Par ailleurs, il existe des méthodes PCR en temps réel ce qui est un avantage majeur. Enfin une confirmation des résultats par électrophorèse est effectuée.

Malgré leurs avantages indéniables, les méthodes génomiques conservent des limites importantes. En effet, elles ne peuvent être envisagées qu'après une phase de croissance, qui retarde l'analyse, et des tests d'orientation qui permettront de sélectionner les séquences d'amorce disponibles commercialement, qui restent couteuses. Par ailleurs la succession de paliers de température au cours des cycles d'amplification (impliquant trois paliers de fusion du double brin d'ADN, d'hybridation des séquences oligonucléotides primaires et de réplication enzymatique par polymérase) freine l'analyse. L'un des automates associé à cette méthode est, par exemple, le FilmArray (BioMérieux). [16] [17]

Des méthodes isothermes comme la LAMP, Loop Mediated Isothermal Amplification, et la RPA, Recombinase Polymerase Amplification, sont actuellement à l'étude afin de réduire le temps d'amplification de l'ADN du fait de l'absence de cycle de température, et de permettre la conception de dispositifs de terrain. [18] Malheureusement cette méthode n'est que pseudo-quantitative.

Finalement, la culture bactérienne, malgré un temps de réponse long pour identifier les agents pathogènes présents, demeure actuellement la méthode standard dans les domaines médical et agroalimentraire.

I.3 Les nouvelles méthodes de détection et les axes de développement

Les méthodes présentées ci-dessus requièrent toutes une étape de culture préalable afin d'obtenir une quantité minimale de biomasse. Réunir en une seule étape la culture, la détection ou mieux encore la culture et l'identification apparait comme la clef pour aboutir à une détection précoce.

De nouvelles technologies ont été développées dont certaines sont déjà commercialisées tandis que d'autres sont encore au stade de la recherche et du développement.

I.3.1 Détection directe

Imagerie par Résonance des Plasmons de Surface (SPRi)

L'une des méthodes développées pour aboutir à une détection rapide durant la croissance est la résonance des plasmons de surface. Cette méthode mesure la variation de l'indice de réfraction au voisinage d'une interface optique dédiée, formée d'une surface plasmonique déposée à la surface d'un prisme. Or l'indice de réfraction est sensible à ce qui se passe au voisinage de l'interface. Ce principe permet d'évaluer l'interaction ligand – récepteur. Une couche réceptrice est immobilisée à la surface du métal. Lorsque le ligand cible se fixe aux récepteurs des variations d'indice sont observées au travers d'une modification de l'effet plasmonique.

L'imagerie par Résonance des Plasmons de Surface (SPRi) permet ainsi la détection spécifique de différentes bactéries durant leur croissance. Les molécules utilisées comme marqueurs de bioreconnaissance sont des protéines de phages ou des anticorps. pour une simple capture de bactéries en solution. L'équipe de T. Livache au CEA Grenoble a développé une technique dynamique pour laquelle la sensibilité est améliorée par la croissance bactérienne. Dans ce cas, la colonisation de surface par les bactéries suite à leur capture est suivie. Cette méthodologie permet en quelques heures (selon leur vitesse de croissance) de détecter quelques unités par mL dans des milieux complexes. [19] [20]

La technologie commerciale PlasmIA ™ (Plasmonic ImmunoAssay, Prestodiag - figure I.2) utilise l'imagerie par résonance plasmique de surface (SPRi) pour révéler la présence d'agents pathogènes *via* une capture antigène-anticorps.

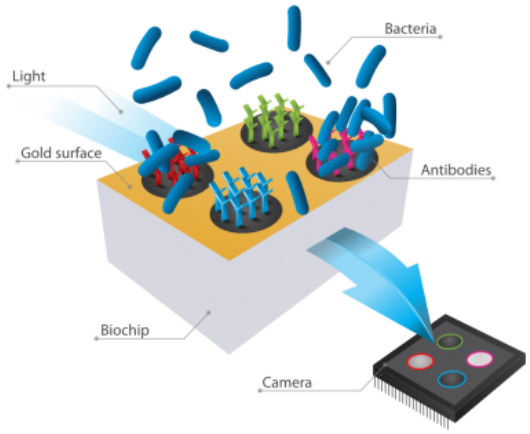


Fig. I.2 – **Principe de fonctionnement de la méthode développée par Prestodiag**. [21] Etat initial : l'échantillon est mis en contact avec le PlasmoChip ; Détection : des ligands spécifiques permettent la détection et l'identification (rouge) multiple. Etat final : visualisation des résultats sous forme d'une image gradée en intensité lumineuse

Le kit commercial SalmoPresto RT est destiné à la détection spécifique de Salmonella. [22] Ce système permet la détection de bactéries pathogènes directement dans un sac de

mélange, pendant l'incubation, sans manipulation préalable de la pesée et de la dilution initiale de l'échantillon. Il peut donner un résultat le jour de l'échantillonnage avec une manipulation minimale et une réponse automatisée. [23]

I.3.2 Détection de la fraction volatile

I.3.2.1 Masse

La spectrométrie de masse est une technique analytique qui permet d'identifier et de doser une substance ou un élément chimique. Elle apporte également des informations sur la composition, la structure et la masse moléculaire de l'échantillon. [24] Pour l'analyse de cultures microbiennes, la spectrométrie de masse est le plus souvent de type MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry). [25] [16] [26] Un fragment de l'échantillon à analyser est prélevé, puis déposé sur une plaque métallique. Une fois dans la chambre d'ionisation, l'échantillon est fragmenté et ionisé par des tirs lasers. Les ions sont accélérés par le bombardement et le champ électrique puis sélectionnés par un champ magnétique selon leur rapport masse sur charge. Le temps de vol des différents composés issus de l'ionisation jusqu'au détecteur permet leur séparation et l'obtention d'un spectre de masse.

Les appareils commerciaux tels que le VITEK MS (BioMérieux), l'AccuPRO-ID (Accugenix) ou le MALDI Biotyper (Bruker) utilisent ces méthodes de spectroscopie. [27] [28] Les avantages certains de cette technologie sont sa rapidité (quelques minutes), sa sensibilité et sa spécificité. Cependant cette efficacité est obtenue aux prix d'un équipement couteux et de la nécessité d'employer un personnel très qualifié.

I.3.2.2 Détection de Métabolites

La croissance des bactéries s'accompagne de l'émission d'un certain nombre de composés dans le milieu environnant. Celui-ci peut aussi bien être un milieu artificiel tel que ceux employés en microbiologie médicale ou industrielle, qu'un milieu naturel comme le sang ou les exsudats ou encore des matrices alimentaires ou des préparations pharmaceutiques. [29]

Les composés ainsi libérés forment le sécrétôme et peuvent être de différents types. [30] Un premier groupe forme le quorum sensing, il s'agit des molécules impliquées dans la communication bactérienne. [31] Un deuxième groupe provient de la dégradation des produits du surnageant, il est ainsi lié au métabolisme des bactéries. Enfin un troisième groupe comprend les toxines et les facteurs de virulences. [1].

1. Ces molécules sont produites par les bactéries ou tout autre pathogène, elles contribuent à la contamination de l'organisme infecté *via* plusieurs effets : colonisation, immunoévasion, appropriation des nutriments de l'hôte

La détection des métabolites bactériens peut être réalisée aussi bien au sein du milieu de culture qu'en phase gazeuse au-dessus du surnageant.

Détection de métabolites en milieu liquide

Une étude électrochimique du quorum sensing en milieu liquide a été menée au sein du département des technologies pour la biologie et la santé du CEA-Leti. Ces travaux ont mis évidence la signature électrochimique complexe et souche dépendante de *Pseudomonas aeruginosa*. [32] [33] La technologie développée prend la forme d'électrode PEDOT :PSS permettant d'amplifier la détection électrochimique en augmentant la surface d'échange et en confinant les bactéries à l'intérieur des électrodes.

Détection de métabolites en phase gazeuse

Parmi les métabolites émis par les bactéries, une fraction d'entre eux passe en phase gazeuse au-dessus du milieu de culture. [10] [34] La figure I.3 classifie les composés organiques volatils microbiens en deux groupes : Les COV émis par un grand nombre de bactéries qui sont des marqueurs de stérilité et les COV produits uniquement par une bactérie ou une famille de bactéries qui peuvent conduire à de la détection spécifique.

Les méthodes en phase gazeuse sont particulièrement intéressantes car elles permettent de s'affranchir de la complexité du milieu liquide. Parmi les méthodes de détection, la plus utilisée est la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse ou l'ionisation de flamme. Bien que très performantes ces méthodes demandent un équipement conséquent ainsi qu'un personnel formé. Il est donc important de développer des méthodes d'analyse à bas coût mais aussi faciles à mettre en œuvre.

Les nez électroniques sont développés pour répondre à cette demande. Il s'agit d'instruments comprenant un réseau de capteurs physico-chimiques avec une faible spécificité. L'analyse d'odeurs simples ou complexes émises est effectuée *via* des profils de reconnaissance de formes associés à la réponse du réseau de capteurs. [35]

Les technologies déployées sont donc de nature très diverses. Quoi qu'il en soit ces méthodes ont en commun de repérer des signatures olfactives. Il s'agit d'attribuer un motif, au sens large, à l'échantillon puis de l'identifier à un composé, par comparaison avec une base de données. [36] Plusieurs approches sont envisagées pour l'étude de ces COV : in vitro donc dans des milieux de culture ou des échantillons ou in vivo en analysant par exemple l'air expiré. [37] L'un des enjeux est de réaliser une mesure non invasive qui permettrait l'analyse du même échantillon a posteriori par des méthodes complémentaires. Bien que peu de systèmes permettent à l'heure actuelle d'aller jusqu'à l'identification, ce concept de détection présente deux avantages majeurs : son coût et son aspect portable ou transportable.

Parmi les nez électroniques, les nez à transduction optique sont qualifiés de nez optoélectroniques.

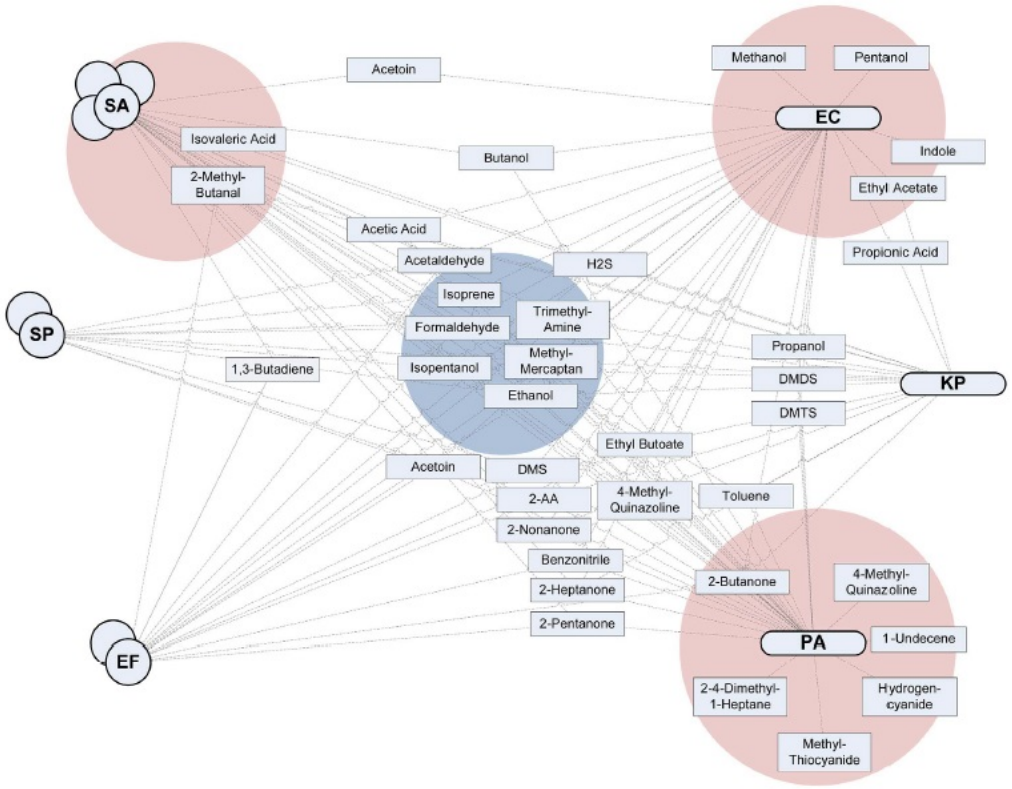


Fig. I.3 – **Diagramme d'émission des composés organiques volatils (COV) pour six bactéries :** *Staphylococcus aureus (SA)*, *Streptococcus pneumoniae (SP)*, *Enterococcus faecalis (EF)*, *Pseudomonas aeruginosa (PA)*, *Klebsiella pneumoniae (KP)* et *Escherichia coli (EC)*. [38]. Le cercle bleu regroupe les COV communs à l'ensemble du panel de bactéries. A l'inverse les cercles rouges indiquent les métabolites produits spécifiquement par une bactérie. Ainsi certains COV sont caractéristiques d'une bactérie ou d'une famille de bactéries tandis que certains sont communs à un grand nombre de bactéries. Le premier groupe peut donc être utilisé comme un ensemble de marqueurs de stérilité, tandis que le second est une voie intéressante pour développer des détections spécifiques.

Nez optoélectronique à capteurs colorés chimio-sensibles

Le nez optoélectronique développé par Specific^{TM} Technologies est un réseau d'indicateurs chimiques colorés incorporés dans une matrice nanoporeuse. [39] [40] [41] Chacun de ces capteurs chimiosensibles possèdent une réactivité chimique particulière selon les espèces volatiles avec lesquelles il réagit. Comme le montre la figure I.4 la matrice colorée change de motif lors de l'exposition de ce nez à différents COV et mélanges de COV.

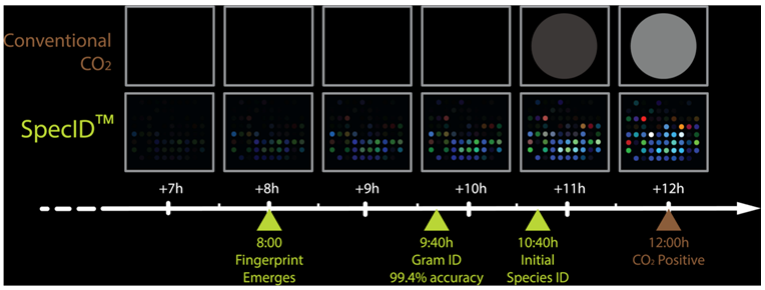


Fig. I.4 – **Détection du CO_2 par un système conventionnel et le système SpecID$_{TM}$** [42]

La transduction colorimétrique est une méthode simple d'usage. Dans ce type de capteurs, des molécules ou pigments chimiosensibles, piégés dans un matériau poreux, voient leur couleur modifiée par l'environnement extérieur. La nature des interactions chimiques est diverse (acides-bases de Lewis, de Bronsted, liaisons H, interactions solvatochromiques). L'interaction des capteurs avec le réseau n'est pas spécifique, mais la réponse de l'ensemble de la matrice permet l'obtention de profils olfactifs qui correspondent à la signature d'un COV.

La figure I.5 illustre le système mis au point par K.Suslick et développé par Carey. [43] Une bouteille d'hémoculture est munie d'une matrice de capteurs chimiosensibles pour la détection et l'identification d'agents pathogènes. Le changement de couleur de la matrice de 36 capteurs est suivi à l'aide d'un scanner. En comparant les images avant et après exposition aux COV, il est possible d'obtenir un vecteur à 108 dimensions, celles-ci correspondant aux intensités dans le vert, le bleu et le rouge. Ces bouteilles d'hémocultures affichent une performance d'identification alliant sensibilité et rapidité.

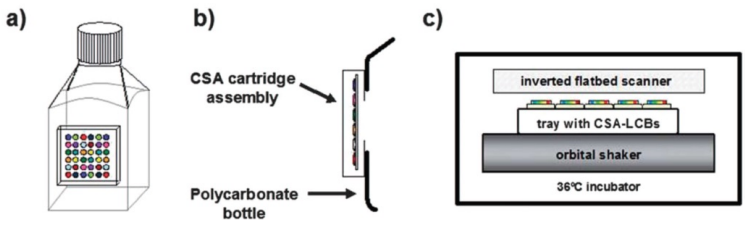


Fig. I.5 – (a)Bouteille d'exposition.(b) Vue détaillée de l'interface entre la bouteille et la matrice de capteurs. (c) Schéma de principe de la bouteille de détection.

Les COV ciblés par ces technologies sont endogènes c'est-à-dire naturellement émis par les bactéries. Il est également possible de cibler le métabolisme particulier d'une bactérie *via* des COV exogènes [2].

2. Les COV exogènes sont issus de la dégradation métabolique d'un composé artificiel ciblant une voie enzymatique particulière à la bactérie recherchée)

I.3.2.3 COV libérés lors du clivage de substrats enzymatiques osmogènes

Les substrats enzymatiques permettent l'étude des activités enzymatiques correspondantes qui révèlent la présence de bactéries particulières. Un substrat enzymatique se compose de deux blocs moléculaires reliés entre eux par une liaison chimique particulière (figure I.6). Celle-ci peut être clivée par une action enzymatique précise, le plus souvent une hydrolyse. Le premier bloc du substrat enzymatique est un composé organique (sucre, acide gras, acide phosphorique ou acide aminé). Le second bloc est libéré dans le milieu après clivage de la liaison par l'activité enzymatique. Un substrat enzymatique est donc d'autant plus intéressant que la molécule libérée est facile à détecter. Un substrat enzymatique est donc un assemblage covalent reconnu par l'action enzymatique ciblée. Pour être dégradé par les bactéries, il doit de plus être hydrosoluble et être en capacité de pouvoir traverser la membrane plasmique des microorganismes pour y entrer. [44] [45]

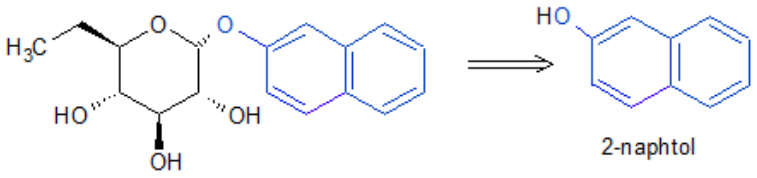


Fig. I.6 – **Substrat enzymatique ciblant l'activité α-glucosiade.** La partie en noir de la molécule est le sucre tandis que la partie en bleu est le composé libéré

Parmi les substrats enzymatiques, un groupe est particulièrement intéressant pour notre étude. Il s'agit des substrats osmogènes, ceux-ci ont en effet la particularité de libérer des métabolites volatils qui n'existent pas naturellement dans le milieu de culture. Sa détection est donc spécifiquement induite par la combinaison {substrat enzymatique – bactérie possédant l'activité enzymatique ciblée}. [46] Pour être compatible avec la détection en phase gazeuse et la transduction optique, un COV exogène doit donc à la fois être hydrosoluble et posséder une constante de Henry [3] élevée afin que sa concentration en phase gazeuse soit suffisante. [47] Par ailleurs le COV exogène libéré par le substrat doit posséder des propriétés d'absorbance, de fluorescence ou encore de luminescence. [48]

I.4 Présentation du sujet de thèse dans le contexte des travaux menés au sein du CEA-Leti

La détection spécifique de COV microbiens en phase gazeuse est un axe de recherche important au sein du Département des Technologies pour la Biologie et la Santé du CEA-Leti. Le principe de la technologie développée consiste à piéger des métabolites au sein

3. La loi de Henry. exprime la relation entre, la quantité de gaz dissous en phase liquide et la quantité de ce même composé en phase gazeuse. L'annexe B (p. 193) regroupe les différentes expressions de la constante de Henry au sein de la littérature.

des matériaux poreux puis de les détecter par transduction optique avec pour but la mise au point de capteurs très peu chers, d'utilisation aisée et faciles à implémenter dans une chaine de culture bactérienne. [49] [50] [51] [52]

Les matrices sol-gels hautement poreuses apparaissent comme de très bons candidats pour capturer des COV. [53] Par ailleurs ces matériaux pouvant être transparents, ils permettent une transduction optique simple. Enfin il s'agit de supports facilement manipulables, pouvant être produits en grande quantité et à faible coup.

I.4.1 Matériaux sol-gels

Le procédé sol-gel [4] permet l'élaboration de céramique, via un sol, la gélification de ce dernier et l'évaporation du solvant. Ce type de synthèse permet de s'affranchir de la fusion ou du frittage de poudres. Les matériaux sont préparés par polymérisation inorganique à partir d'alcoxydes de métal, généralement de silicium. [54] Les alcoxydes de silicium sont hydrolysés par l'ajout d'eau puis condensés (Figure I.7).

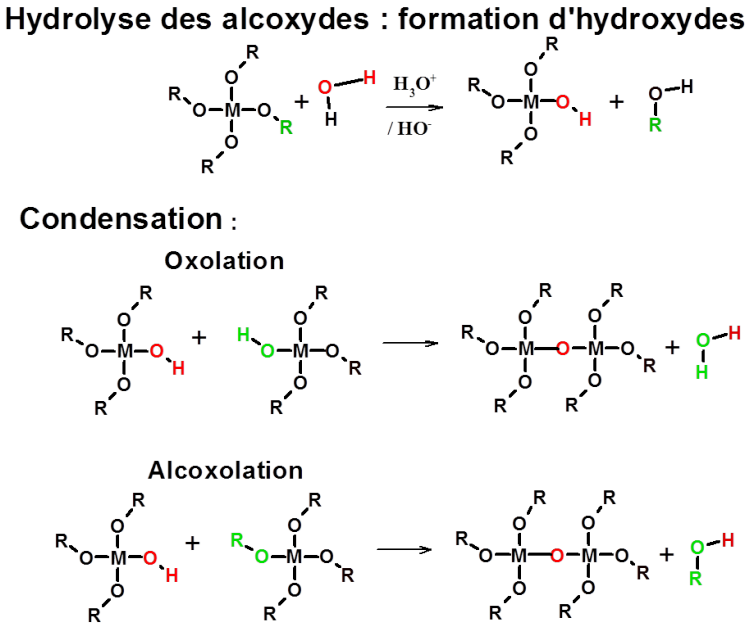


Fig. I.7 – **Principe de la synthèse par voie sol-gel.** La première étape correspond à une réaction d'hydrolyse des alcoxydes et de formation d'hydroxydes. La seconde étape met en jeu des réactions de condensation (oxolation ou alcoxolation)

Selon que l'hydrolyse ou la condensation est favorisée, le réseau tridimensionnel ainsi formé sera plus ou moins dense. (Figure I.7). Les conditions de gélification et de séchage jouent également un rôle crucial. Elles déterminent la nature du matériau obtenu (Figure I.8).

4. Sol : Suspension colloïdale,dans un solvant, de particules solides dispersées. Gel : Système colloïdal à caractère visqueux voire solide, dans lequel les particules dispersées forment un réseau ramifié, interpénétré par un solvant.

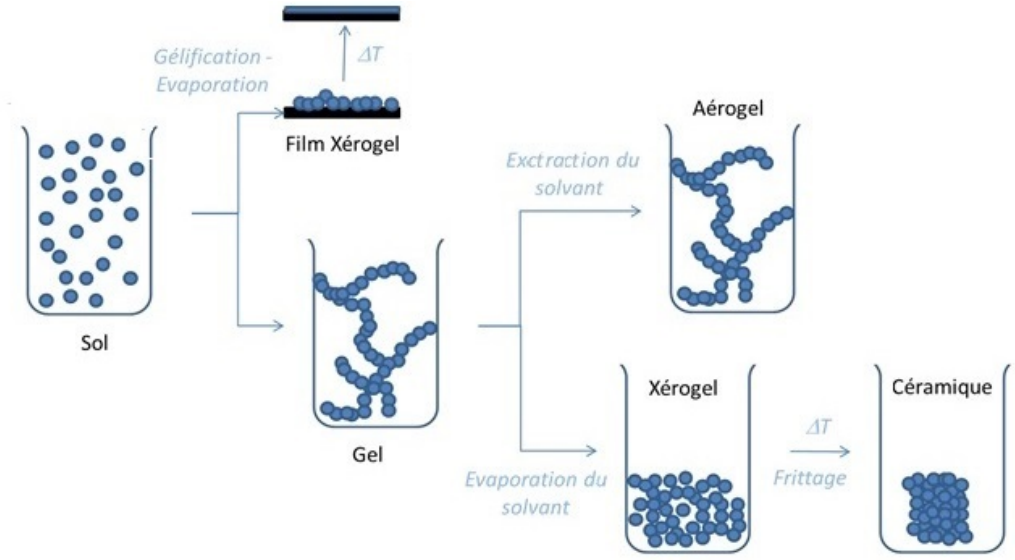


Fig. I.8 – **Les différents types de matériaux obtenus par synthèse sol-gel**

A partir du gel, il est possible de former des aérogels et des xérogels. La fabrication d'aérogel revient à éviter la transition liquide gaz. Cela est possible en contournant le point critique, à des conditions de pressions et de températures extrêmes (Figure I.9 – flèche bleue). La suppression de la tension de surface qui en résulte permet d'éviter un rétreint du matériau, les pores formés sont alors macroporeux. Dans des conditions de séchage plus classiques (Figure I.9– flèche violette), il y a formation de xérogels, ceux-ci sont plus denses et possèdent des pores plus petits micro- ou méso- poreux.

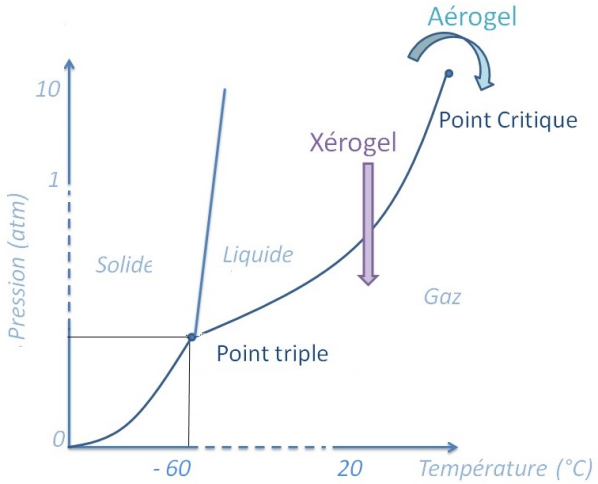


Fig. I.9 – **Diagramme de phase du CO_2** illustrant les différents modes de séchage des matériaux sol-gels. Le séchage supercritique (flèche bleue) contourne le point critique du fluide considéré afin d'éviter la transition directe liquide-gaz d'un séchage ordinaire (flèche violette)

LAPIN Il est possible d'ajouter des éléments organiques à ces réseaux pour former des matériaux hybrides. Ces matériaux sont classés en deux types selon les interactions liant

les parties inorganiques et organiques. Les matériaux de classe I incorporent des molécules organiques dans des réseaux inorganiques et inversement. Il n'y a pas de liaisons fortes, les différents éléments ne sont que juxtaposés. A l'inverse, dans les matériaux dits de classe II, les parties inorganiques et organiques sont fortement liées. Les ORMOCERs (ORganically MOdified CERamics) appartiennent à ce groupe. Les ORMOCERs rassemblent des matériaux pour lesquels, les précurseurs mixtes possèdent un atome central minéral de titane, de zirconium ou d'aluminium. Dans le cas des organoalcoxysilanes, le terme ORMOSILs (ORganically MOdified SILoxanes) est spécifiquement employé (Formule I.1).

$$R_xSi - (OR')_{4-x} \tag{I.1}$$

Dans le cadre de l'élaboration des matériaux présentés ci-dessus, la stratégie de synthèse impose une étape pour extraire le porogène ou co-solvant par lavage ou calcination afin d'optimiser la porosité. [55] Le choix d'incorporer des sondes organiques au sein du matériau au cours de la synthèse, et non après synthèse, nous a amenés à travailler sur des formulations sans élimination du précurseur fonctionnel. Loin d'être une contrainte, cette voie s'est avérée être une possibilité de fonctionnaliser la surface développée du matériau. Dans la suite de ce travail, nous identifierons ces fonctions organiques liées sous la notion de porogène. Il ne s'agit bien évidemment pas d'un porogène au sens stricte (un porogène étant un objet ou un assemblage moléculaire, non lié, sacrificiel permettant la formation du pore par extraction). Toutefois, comme leur introduction modifie de façon drastique la porosité du matériau nous avons étendu cette dénomination à ces agents correspondant rigoureusement à des agents modificateurs de structure. [56]

I.4.2 Détection de métabolites microbiens *via* des sol-gel mésoporeux

L'avantage notable de cette technologie est qu'il n'y a plus d'étape de pré-concentration avant la détection. Les métabolites microbiens sont en effet concentrés au sein du capteur sol-gel par adsorption dans la porosité. La transduction optique qui s'en suit est directe et en temps réel puisque la présence du COV est révélée *in situ* par absorbance ou fluorescence.

Au cours de travaux précédents, deux voies ont été explorées. Il est possible de détecter directement l'un des COV émis naturellement par la bactérie ciblée. C'est par exemple le cas des agents pathogènes émettant de l'H_2S illustré figure I.10. La seconde stratégie consiste à induire la production de manière spécifique d'un COV aux propriétés optiques intéressantes. [57] Pour ce faire un substrat enzymatique est introduit dans le milieu de culture, il pourra être spécifiquement métabolisé par la bactérie cible. La figure I.11 présente la détection d'*E.coli* selon cette méthode de détection.

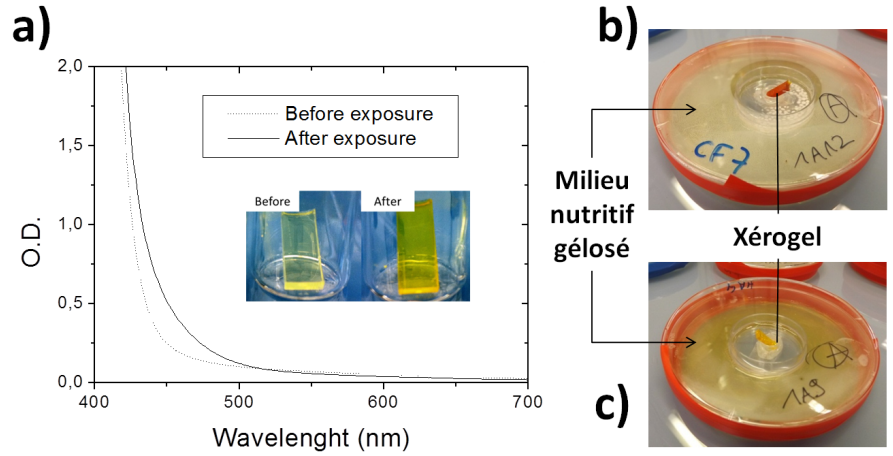


Fig. I.10 – **Détection l'H_2S** a) Détection l'H_2S chimique à 10 ppm. Au cours de l'exposition l'absorbance du xérogel évolue visuellement : celui-ci devient de plus en plus foncé. [58] b) La couleur orange foncé du capteur après exposition prouve que la bactérie a émis de l'H_2S c) A l'inverse la couleur jaune clair témoigne de l'absence d'H_2S

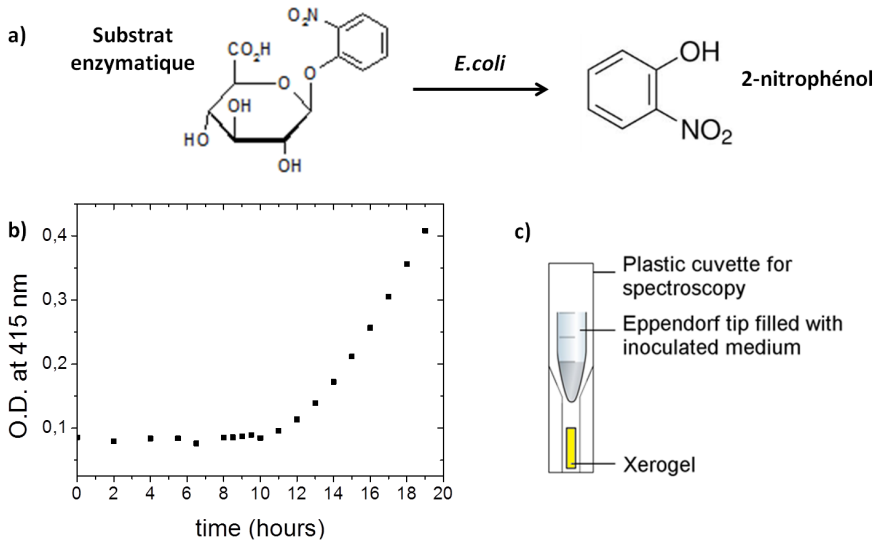


Fig. I.11 – **Détection du 2-nitrophénol (2-NP) libéré par une culture de *E.coli*** (inoculation initiale : 100 ufc.mL^{-1}. a) Clivage du substrat par *E.coli* libérant le 2-NP. b) Evolution de l'absorbance du xérogel à 415 nm au cours du temps. c) Montage dans lequel a été réalisée la détection : il n'y a pas de contact direct entre la solution et le capteur sol-gel.

Afin de permettre une capture efficace des COV présents en phase gazeuse, le matériau doit donc être poreux, avec une surface spécifique élevée tout en ayant une affinité pour le COV ciblé et permettre une détection optique dans le visible.

Pour répondre à ce cahier des charges, nous développons des matrices sol-gel nanoporeuses. La figure I.12 présente la caractérisation de l'un des matériaux préalablement développés, pour la capture du 2-Nitrophénol.

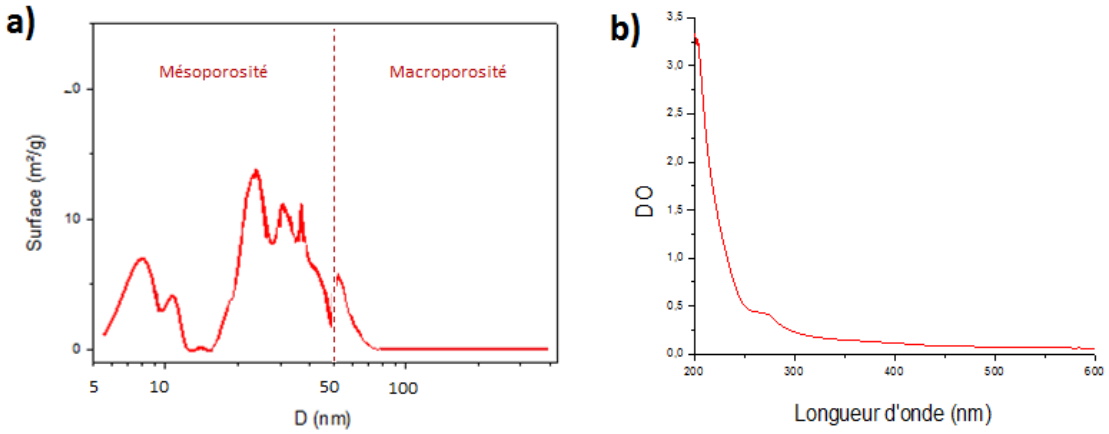


Fig. I.12 – **Caractérisation de matrice nanoporeuse développée au sein du CEA-Leti.** Ce matériau sol-gel présente une forte surface spécifique ($\simeq$600 $m^2.g^{-1}$). a) Distribution des tailles de pores b) Spectre d'absorbance du matériau. La porosité permet de piéger des COV au sein du matériau, la transparence dans le domaine visible permet une transduction optique simple. [59]

Les matériaux sol-gel nanoporeux répondent au cahier des charges de capture du COV et de transduction optique directe. La grande surface spécifique ($\simeq$600 $m^2.g^{-1}$), la porosité ainsi que la fonctionnalisation de surface sont fonction des formulations et protocoles de synthèse. [60] La capacité de ces matériaux à piéger les composés volatils a permis le développement d'applications variées allant de la dépollution de l'air au diagnostic médical. [61] [62] Dans le cadre de la détection de COV microbiens par transduction optique directe, l'accumulation de COV dans une matrice poreuse permet donc de révéler leur présence en absorbance ou en fluorescence.

Afin d'obtenir des propriétés optiques détectables, deux stratégies sont possibles. La première consiste à introduire une molécule sonde au sein de la formulation. Cette molécule sonde, si elle est bien choisie réagit avec le COV ciblé pour former un produit coloré, absorbant ou fluorescent facile à détecter par transduction optique. La seconde stratégie consiste à induire l'émission d'un composé aux propriétés optiques intéressantes *via* la dégradation de substrat exogène. Dans ce cas la spécificité provient de l'activité enzymatique nécessaire au clivage du substrat.

Un prototype d'hémoculture de détection ciblée de *E.coli*, *via* l'activité enzymatique β-glucuronidase, a ainsi pu être mis en œuvre. La détection est effectuée dans un flacon muni d'un bouchon instrumenté d'un rétroréflecteur en matériau sol-gel (Figure I.13). Cette méthode permet une détection dans le sang de 100 ufc.mL^{-1} de *E.coli* en 10 h

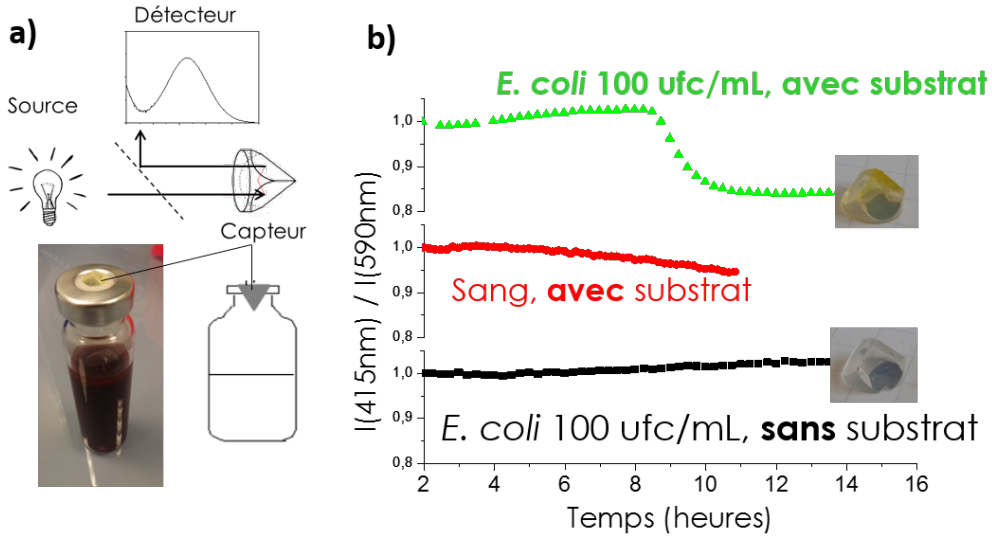


Fig. I.13 – **Prototype d'hémoculture :** a) schéma du montage : le capteur est introduit dans le bouchon du flacon, la transduction est une réflexion. b) détection ciblée de *E.coli*. L'activité enzymatique β-glucuronidase permet à la bactérie de libérer du 2-Nitrophénol après 10 h d'incubation (courbe en vert). Ce graphique montre que le sang possède également cette activité enzymatique mais que celle-ci n'entrave pas la détection de *E.coli*

Les travaux précédents ont mis en évidence la capacité des sol-gel mésoporeux à capturer, accumuler et révéler des COV d'origine microbienne par une transduction en absorbance. [63] [57] Deux axes de travail restent néanmoins à explorer pour poursuivre la détection ciblée de COV microbiens par transduction optique sol-gel. D'une part la formulation actuelle du capteur indole utilise l'acide chlorhydrique comme catalyseur, cet acide volatil s'échappe de la matrice empêchant l'emploi d'autres capteurs de nature différente en parallèle, il apparait donc intéressant de travailler à des nouvelles méthodes de détection de l'indole. D'autre part le développement de méthodes de détection en fluorescence pourrait apporter une meilleure sensibilité tout en permettant l'obtention de la spécificité *via* des couples longueurs d'ondes d'émission et d'excitation.

Le premier axe de ces travaux de thèse étudie la faisabilité d'une méthode d'identification de l'agent pathogène microbien *via* une analyse globale des métabolites émis par un milieu de culture. Tandis que la seconde partie poursuit la démarche de détection spécifique des agents pathogènes ciblés dans des conditions proches des normes agro-alimentaires.

I.4.3 Déroulement des travaux

Les méthodes de détection préalablement développées ciblaient donc un COV particulier, celui-ci pouvant être un COV endogène, émis naturellement par la bactérie cible ou un COV exogène libéré par la rupture spécifique d'un substrat enzymatique.

Le premier objectif de cette thèse est l'élaboration de nouvelles voies de transduction,

via la signature globale des métabolites d'un pathogène, pour permettre l'identification par spectroscopie UV-visible. Le second objectif est la mise en place d'un système de détection ciblée pouvant être utilisé lors de la croissance des pathogènes. Nous avons élaboré ce système en nous basant sur une matrice alimentaire dans un sac d'homogénéisation, qui est un format classique de culture en agro-alimentaire.

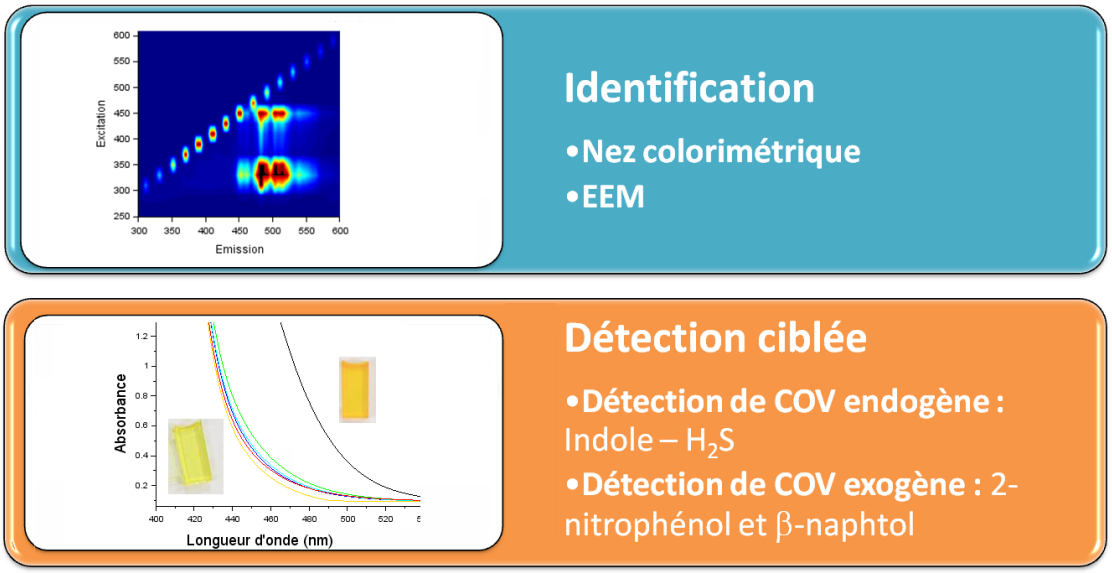


Fig. I.14 – **Axes d'études :** Identification par analyse globale du profil olfactif ; Détection spécifique *via* des COV ciblés

I.4.3.1 Choix des modes de transduction

Pour répondre à la première problématique, il a été proposé d'étudier les profils olfactifs de cultures bactériennes dans leur ensemble. La philosophie de ce mode d'identification est donc la détection globale de métabolites plus ou moins spécifiques d'un pathogène afin d'en extraire un motif particulier qui par comparaison avec une base de données permettra de reconnaitre le COV ainsi détecté. Deux stratégies d'analyse globales ont ainsi été étudiées.

La première consiste en la mise en place d'un réseau de capteurs sol-gel incorporant des molécules chimio-sensibles colorées interagissant chacune de manière non-spécifique avec les différents métabolites émis par les pathogènes. La spécificité provient de la réponse spectrale globale de ce Nez artificiel formée par la réponse de l'ensemble des xérogels.

Cette approche multi-capteurs permet donc l'obtention d'un motif spécifique. Une autre stratégie pour recueillir un motif spécifique est l'acquisition de matrices émission-excitation de fluorescence. Il s'agit d'un double balayage en longueur d'onde d'excitation et d'émission, les espèces fluorescentes y apparaissent selon des coordonnées correspondant à des couples longueurs d'excitation, longueur d'onde d'émission.

Le second axe d'étude évalue la possibilité de procéder à une détection multi-capteurs ciblée permettant la détection de pathogènes directement lors de leur croissance dans un consommable usuellement utilisé en microbiologie industrielle.

I.4.3.2 Méthodologie d'étude

Pour chacun des trois axes de recherches, la méthodologie de travail a été la suivante :

- Formulation des xérogels répondant au cahier des charges du mode de transduction envisagé.
- Evaluation de l'efficacité des xérogels vis-à-vis de COV générés chimiquement dans des atmosphères calibrées.
- Evaluation de la capacité des xérogels à révéler la présence de pathogènes.

Le chapitre II s'attache à l'étude de différentes formulations de xérogels afin de définir les précurseurs fonctionnalisés les plus probants pour la fonctionnalisation de nos xérogels. Le chapitre III est dédié à l'analyse globale d'un profil olfactif des COV endogènes, d'abord en absorbance avec sonde aspécifique puis en fluorescence sans sonde. Le Chapitre IV est consacré à l'étude de COV ciblés afin de proposer une détection multi-capteurs où chaque capteur permet la transduction d'un COV spécifique.

Chapitre II

Formulations et caractérisations des xérogels

Ce chapitre s'articule autour de la compréhension du matériau. D'une part, nous nous sommes intéressés aux caractéristiques physico-chimiques de nos sol-gels, en caractérisant l'hydrophobie des matériaux et l'acido-basicité des pores. D'autre part, nous avons abordé la caractérisation structurale des sol-gels mésoporeux par une nouvelle voie d'analyse : la diffusion de rayons X aux petits angles.

Les informations apportées par ces modes de caractérisation divers sont complémentaires, elles permettront de valider ou d'infirmer les hypothèses liées à la structure du matériau.

II.1 Études et sélections préliminaires des matériaux sol-gels

II.1.1 Modèle et méthodologie

La figure II.1 est une représentation des xérogels, couramment admise au cours de travaux précédents. [63] [57] Il s'agit d'un réseau hybride de chaines inorganiques portant des groupes fonctionnels organiques.

Les xérogels doivent présenter une tenue mécanique permettant qu'ils soient non friables et aisément manipulables. De plus les xérogels doivent être transparents et de pas absorber aux longueurs d'ondes d'intérêts pour mettre la transduction optique. Les limites de détection en absorbance sans sonde de deux COV de référence, l'indole et le 2-nitrophénol, ont été déterminées par spectroscopie d'absorbance afin d'identifier les formulations les plus efficaces pour détecter ces deux COV.

Les matériaux sol-gel se caractérisent par leur interface entre le solide poreux et le fluide (liquide ou gaz) à l'intérieur des pores. Les valeurs caractéristiques des surfaces dévelop-

pées des matrices sol-gels sont particulièrement intéressantes car élevées ($\geqslant 200$ $m^2.g^{-1}$). Il s'agit ici de caractériser l'influence des différents précurseurs fonctionnels. Les mesures de surfaces spécifiques ont été obtenues par adsorption-désorption d'azote, selon la théorie Brunauer, Emmett et Teller.

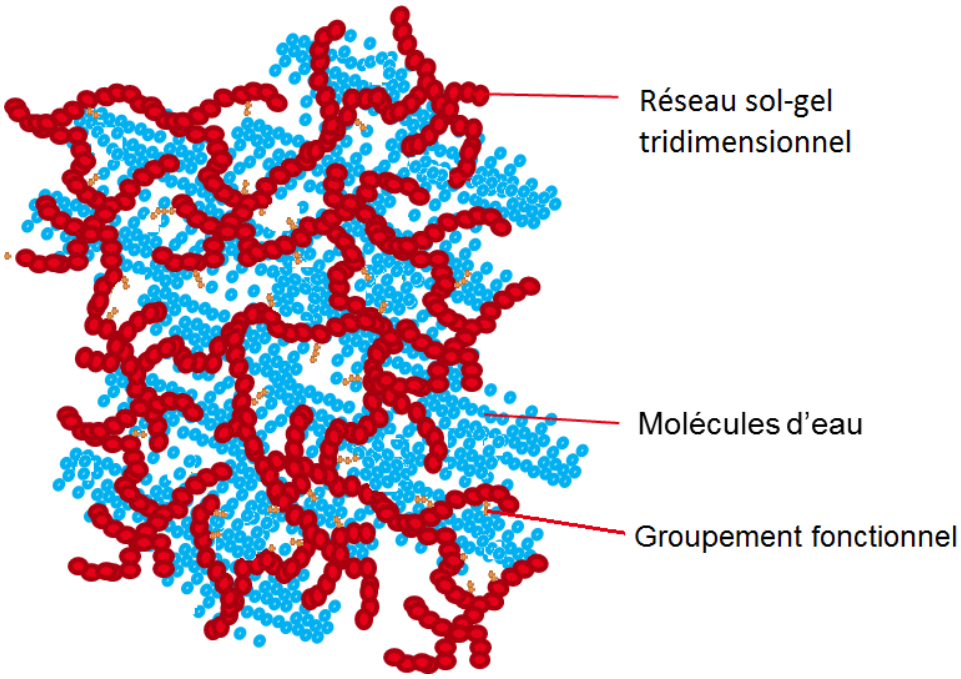


Fig. II.1 – Modèle de la structure des xérogels mésoporeux fonctionnalisés. Le réseau est constitué par des chaînes de silice formant des pores. Ces derniers forment des micro-réacteurs contenant des molécules d'eau. Les groupements fonctionnels se trouvent en surface du réseau de silice et fonctionnalisent localement leur environnement.

Lors de la polycondensation, le réseau de silice se forme par hydrolyse puis condensation, cependant la présence de groupements fonctionnels gêne stériquement la réaction de polymérisation de la silice, créant ainsi une porosité particulière au sein de la matrice xérogel.

Cette structure pose la question de l'influence de plusieurs paramètres :

— Influence de la nature du précurseur fonctionnalisé (encombrement de chaîne, nature chimique ...)
— Effet de la concentration en groupements fonctionnels
— Procédure de séchage

Deux niveaux d'étude de la porosité sont alors envisageables. D'une part, la mésoporosité née de la présence du silane fonctionnalisé ; d'autre part, la microporosité intrinsèque à la matrice. Par ailleurs, il peut être intéressant d'étudier la nature de l'interface.

II.1.2 Influence de la nature du silane fonctionnalisé

Le type de groupement fonctionnel porté par le précurseur minoritaire permet la fonctionnalisation des xérogels *via* la réactivité du groupement fonctionnel. Parmi les caractères liés à la surface des pores, deux sont particulièrement importants : le caractère acido-basique et le caractère hydrophobe-hydrophile.

L'eau, présente dans l'atmosphère ou dans le milieu de culture, pénètre à l'intérieur des pores de nos matériaux. De fait, une partie de la surface spécifique des xérogels n'est alors plus disponible pour interagir avec les COV. L'idée de moduler le caractère hydrophile / hydrophobe des xérogels apparait intéressante pour garantir une disponibilité des pores vis-à-vis des COV. [64] [65] [66]

Le caractère hydrophobe apparait donc être un critère possible pour sélectionner le précurseur fonctionnalisé à inclure dans les formulations.

II.1.2.1 Détermination du cahier des charges des xérogels et des caractéristiques importantes de ces derniers

Différents précurseurs fonctionnalisés ont été testés dans des formulations TMOS/MeOH/H_2O/précurseur fonctionnalisé de ratio molaire : 1/5/4/0,03, séchées sous hotte à atmosphère et température ambiante selon le protocole présenté en annexe page 167. Pour évaluer ces formulations, différents critères ont été observés.

Caractère hydrophobe-hydrophile

Le caractère hydrophobe a été évalué par mesures d'angles de contact à l'aide d'un Digidrop (Scientific Instruments). Une goutte d'eau de 1,5 µL est déposée sur la surface du xérogel, une photo est prise après 20 s de dépôt et lorsque cela est possible, l'angle de goutte est alors mesuré. L'étude de Marjorie VRIGNAUD compare l'angle de gouttes pour quatre alcoxysilanes : ABTES, APTES, PhTMOS et FTMOS [1]. [63] Elle montre ainsi que l'augmentation du taux de précurseur fonctionnalisé permet d'accroitre le caractère hydrophobe, tant que le taux de précurseur fonctionnalisé reste inférieur en ratio molaire à 0,15. C'est particulièrement le cas pour les alcoxysilanes aminés. Ainsi l'angle de goutte d'un xérogel ABTES passe de 15° pour un ratio de précurseur fonctionnalisé de 0,03 à 85° pour un ratio de précurseur fonctionnalisé de 0,15.

Influence de l'étape de séchage

Le temps de synthèse (gélification et séchage compris) devra être inférieur à deux semaines car l'aspect applicatif impose des délais de production courts. Cependant il ne

1. ABTES : 4-aminobutyltriéthoxysilane ; APTES : 3-aminopropyltriéthoxysilane ; PhTMOS : p-aminophenyltrimethoxysilane ; FTMOS : trimethoxy(3,3,3-trifluoropropyl)silane

doit pas masquer l'importance des notions de vitesse de gélification et de séchage sur la structure du xérogel. L'étape de gélification joue un rôle clef dans la structuration des xérogels. Durant cette étape, deux phénomènes interviennent en parallèle : la gélification d'une part et l'arrangement du réseau d'autre part.

Par ailleurs, la forme des monolithes est également étudiée. La figure II.2 schématise les différentes formes de xérogels obtenues. Celles-ci sont principalement fonction du temps de gélification. Un ménisque le moins marqué possible (monolithe A) est apprécié, les monolithes étant alors plus homogènes comme nous le verrons *via* les analyses par SAXS.

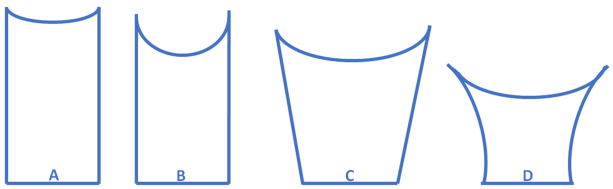


Fig. II.2 – Schéma des formes de xérogels obtenus.

Les formes A et B correspondent à des xérogels où la gélification est intervenue avant le début de l'évaporation des solvants. Pour les xérogels C et D, une partie du solvant s'est évaporée avant la fin de la gélification. Le xérogel D présente l'évaporation avant gélification la plus importante. En contrôlant le procédé de séchage et donc en évitant une évaporation précoce avant gélification, il est possible de favoriser les formes A ou B.

Le temps de synthèse (gélification et séchage compris) devra être inférieur à deux semaines car l'aspect applicatif impose des délais de production courts. Cependant il ne doit pas masquer l'importance des notions de vitesses de gélification et de séchage sur la structure du xérogel. L'étape de gélification joue un rôle clef dans la structuration des xérogels. Durant cette étape deux phénomènes interviennent en parallèle, la gélification d'une part et l'arrangement du réseau d'autre part.

Le premier constat visible en lien avec le temps de gélification est la forme du ménisque. Plus la gélification intervient tard plus il est prononcé. D'un point de vue structural, il est pressenti qu'une gélification courte, suivie d'une évaporation rapide, permettra uniquement un arrangement local, tandis qu'une évaporation plus lente conduira un taux de condensation supérieur donc à un réseau d'oxyde plus dense.

Durant les phases de séchage et de rétreint [2] qui suivent la gélification, il n'y a plus de réarrangement. Cette étape est cependant importante car il y a un risque de pollution du xérogel formé par le milieu environnant. Ce qui est particulièrement gênant dans le cas de transduction par fluorescence.

2. Le terme rétreint vient de la métallurgie, où il désigne la diminution de volume d'un matériau par suite d'un séchage, d'un refroidissement. Dans le cas des sol-gels, il s'agit d'une réduction de volume observable lors de la condensation et l'évaporation des solvants.

II.1.2.2 Les différents précurseurs secondaires et les xérogels qui en sont issus

Le tableau II.1 présente l'ensemble de alcoxysilanes testés au cours de cette thèse, le TMOS et le TEOS l'ont été comme précurseurs principaux tandis que les autres l'ont été comme précurseur fonctionnalisé. Le ratio molaire des précurseurs fonctionnalisés étant de 0,03, donc très faible par rapport au ratio de précurseur principal, il paraissait raisonnable d'espérer une fonctionnalisation des xérogels tout en dégradant peu la tenue mécanique et les propriétés optiques des xérogels.

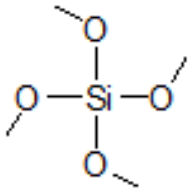
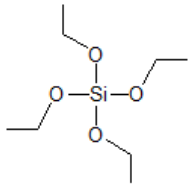
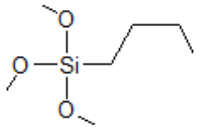
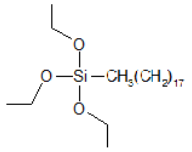
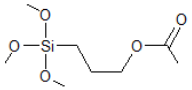
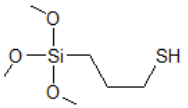
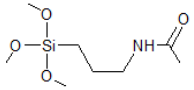
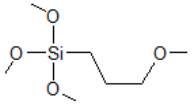
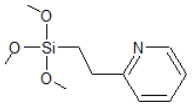
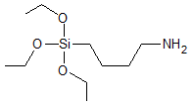
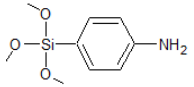
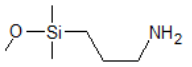
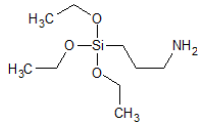
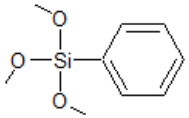
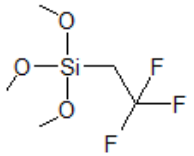
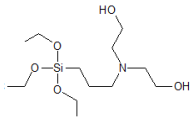
Le tableau II.2 regroupe les différentes données et caractéristiques des précurseurs fonctionnalisés testés. Contrairement à l'hypothèse faite précédemment, la présence du précurseur fonctionnalisé modifie les propriétés optiques et la tenue mécanique. En particulier, les groupements fonctionnels de certains xérogels absorbent considérablement et empêchent toute détection directe en absorbance de l'indole.

Les précurseurs fonctionnalisés conduisant à des poudres et non à des monolithes sont écartés directement. Ceux ne résistant pas à l'humidité sont à leur tour mis de côté. Il est à noter que sur les trois précurseurs fonctionnalisés écartés à ce motif deux se sont révélés être à tendances hydrophobes tandis que le troisième est très hydrophile.

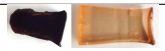
Au vu de ces résultats et notamment des temps de détection de l'indole et du 2-nitrophénol, trois formulations ont été retenues pour poursuivre l'étude des différents modes de transductions :

— 4-aminobutyltriéthoxysilane (ABTES - CAS 3069-30-5)
— 4-aminopropyltriethoxysilane (APTES - CAS 919-30-2)
— n-butyltrimethoxysilane(n-butyl - CAS 1067-57-8)

Les deux premiers possèdent un groupement amine tandis que le troisième possède une simple chaîne alkyle. L'ABTES et l'APTES sont *a priori* équivalents en terme de fonctionnalisation du xérogel. Par ailleurs, cette étude préliminaire montre que le caractère hydrophobe-hydrophile du groupement fonctionnel n'influençait pas la détection des COV.

TMOS	TEOS	n-butyl	ODTES
			
Tetramethoxysilane	Tetraethylorthosilicate	n-Butyltrimethoxysilane	N-octadecyltriethoxysilane
TMSP	TMSPT	TMSPA	3MPTMS
			
3(Trimethoxysilyl)propyl acetate	Trimethoxysilylpropanethiol	N-(3-trimethoxysilylpropyl)acetamide	3-Methoxypropyltrimethoxysilane
PETMS	ABTES	APhTMS	APMTES
			
2-(2-Pyridyl)ethyltrimethoxysilane	(4-aminobutyl)triethoxysilane	p-Aminophenyltrimethoxysilane	(3-aminopropyl)dimethylethoxysilane
APTES	PhTMS	TFTMS	HEAPTES
			
(3-aminopropyl)triethoxysilane	Phenyltrimethoxysilane	3,3,3-Trifluoropropyltrimethoxysilane	N-(3-Triethoxysilylpropyl)diethanolamine

Tab. II.1 – Alcoxysilanes testés comme précurseurs fonctionnalisés

Précurseur secondaire	CAS	pKa^{GF}	$t_{synthese}$	Monolithe	$t_D^{[indole]=100ppb}$	$t_D^{[2-NP]=100ppb}$	S_{BET} $(m^2.g^{-1})$	α_g
HEAPTES	7538-44-5	ND	11 Jours		⚠	🥀	390	$< 10°$
n-butyl	1067-57-8	ND	15 Jours		<20 h	1 h	760	71°
3MPTMS	33580-59-5	3,5	6 Jours		72 h	24 h (signal ≠ oNP)	400	
ODTES	7399-00-0	AF	/	Poudre	/	/	/	/
TMSP	59004-18-1	6,5	3 Jours**		⚠	∞	530	52°
TMSPT	4420-74-0	7	5 Jours		🥀	🥀	NE	🥀
TMSPA	57757-66-1	8	/	Poudre	/	/	/	/
PETMS	27326-65-4	9	8 Jours		⚠	16h	380	
ABTES	3069-30-5	10-11	3 Jours **		18 h	20 mn	470	15°
APhTMS	33976-43-1	10-11	6 Jours *		⚠	16h	500	$< 10°$
APMTES	18306-79-1	10-11	6 jours *		⚠	24 h	490	$< 10°$
APTES	919-30-2	10-11	3 Jours *		20 h	25 mn	480	$< 15°$
PhTMS	2996-92-1	BF	21 Jours		🥀	🥀	210	25°
TFPTMS	429-60-7	BF	5 Jours		∞	∞	510	80°

Tab. II.2 – Caractérisation des différentes formulations de xérogels ayant comme précurseur le TMOS ainsi qu'un silane fonctionnalisé

⚠Les xérogels absorbent intrinsèquement aux longueurs d'onde d'intérêt, $\lambda^{indole} = 270$ nm et $\lambda^{2NP} = 415$ nm.// 🥀 : Les xérogels se sont fissurés et morcelés pendant l'exposition.//∞ Aucun pic n'a été observé après une semaine d'exposition au COV. //* : Refroidissement dans un bain de glace // ** : Refroidissement à l'azote liquide (-20°C). // NE : La réponse donnée par l'adsorption-désorption d'azote n'est pas exploitable. //AF : Acide fort // BF : Base forte // ND : Non déterminé // $t_{synthese}$: temps de gélification plus temps de séchage pour atteindre le rétreint définitif .

II.1.3 Le pH intra-pores des xérogels

L'humidité environnant le xérogel pénètre à l'intérieur du réseau. L'application visée impose la mise en place d'un outil évaluant le caractère acido-basique des xérogels.

Il est impropre de parler de pH pour un xérogel. En effet, à l'échelle de la nanoporosité, la première couche est probablement de l'eau liée où la notion de pH atteint ses limites. Une partie des couches suivantes étant constituée d'eau libre, la notion de pH y est alors plus pertinente. Le pH équivalent est le pH de la solution aqueuse intra-pores. Il sera déterminé pour différentes formulations (cf. p.42).

L'intérieur des pores des xérogels est probablement constitué d'eau liée et d'eau libre. Notre modèle de travail décrit la porosité de nos matériaux comme une succession de petits réacteurs juxtaposés où l'eau liée est négligée. Les réacteurs sont considérés comme remplis d'une solution aqueuse dans laquelle sont dissoutes différentes espèces chimiques (Figure II.3). Les groupements fonctionnels présents, au sein du réseau, influencent alors le pH de cette solution aqueuse. Il est ainsi possible de parler de pH de la solution aqueuse intra-pores d'un xérogel. La notion de pH intra-pores, aussi appelé pH équivalent, bien que non unanimement reconnue, est un outil employé dans plusieurs travaux de référence dans le domaine des silices nanoporeuses fonctionnalisées. [67] [68]

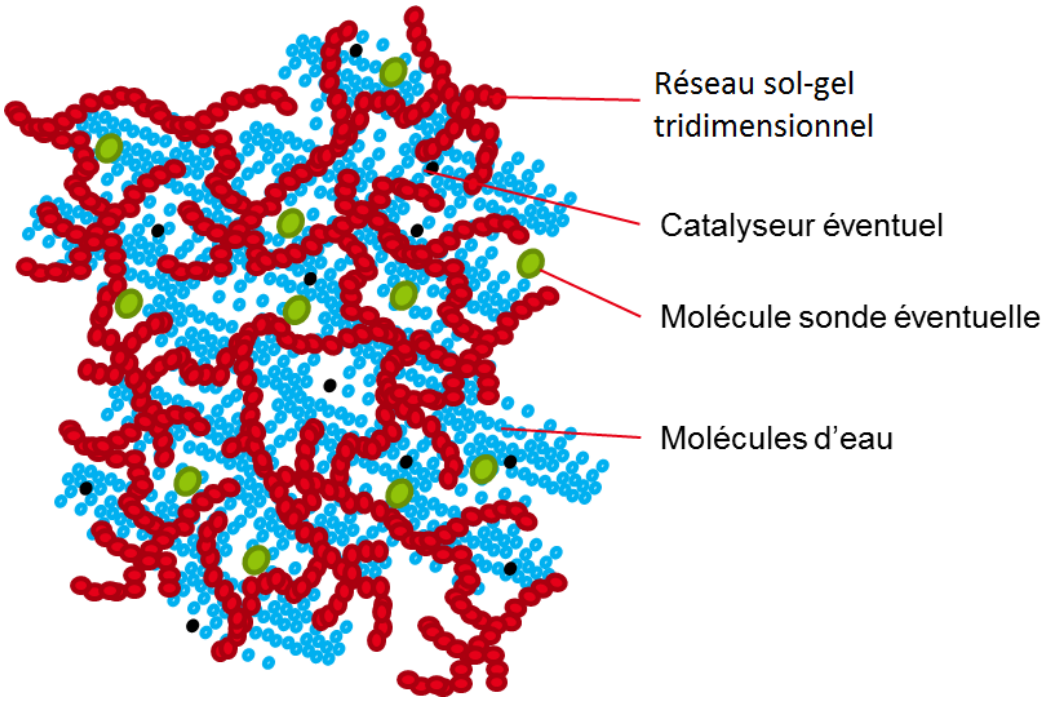


Fig. II.3 – Modèle de la structure des xérogels mésoporeux fonctionnalisés. Les molécules de catalyseurs ainsi que les molécules sondes chimio-sensibles ne sont pas liées au réseau d'oxyde, elles sont simplement piégées au sein des pores, ce qui selon leur taille rend possible leur diffusion.

Sur le plan purement applicatif, le pH de la solution aqueuse intra-pores ou pH équivalent (pH_{eq}) est un outil de classification intéressant des xérogels. En effet, les COV sont volatils sous forme moléculaire. Ils sont stabilisés sous forme ionique au sein du xérogel,

permet donc de limiter les phénomènes de relargage. Contrôler le pH_{eq} intra-pore permet également de cibler la forme la plus absorbante d'une espèce chimique selon son état de protonation, comme le montre le cas du 4-nitrophénol présenté page 42. Nous avons donc déterminé le pH de la solution aqueuse intra-pore des trois précurseurs fonctionnalisés sélectionnés pour poursuivre l'étude.

II.1.3.1 Evaluations du pH des solutions aqueuses intra-pores des xérogels ayant le n-butyl, l'ABTES et l'APTES comme précurseur fonctionnalisé

Incorporation d'indicateurs colorés de pH dans la formulation des xérogels

Lors de la mise en place de la transduction en absorbance avec sondes peu spécifiques, plusieurs indicateurs acido-basiques, (bleu de bromophénol (BBP), bleu de bromothymol (BBT) et bleu de thymol (BT)), ont été introduits au sein des formulations de xérogels. La gamme de couleurs qui en résulte nous permet d'évaluer le pH de la solution aqueuse intra-pores. Le BBP est jaune pour un pH < 3, et bleu pour un pH $> 4{,}6$. Le BBT possède deux zones de virages et prend donc trois couleurs selon le pH : rose pour un pH < 0, jaune pour un pH compris entre 0 et 6, puis bleu pour un pH $> 7{,}6$. Le BT est rouge pour un pH $< 1{,}2$, jaune pour un pH compris entre 2,8 et 8, puis bleu pour un pH $> 9{,}6$.

La couleur des xérogels et la forme (ionique ou moléculaire) prise par les indicateurs colorés dépendent de l'environnement dans lequel se situent les molécules. Celui-ci est constitué de l'eau adsorbée sur la surface de la silice et la silice elle-même.

La surface des pores est constituée de deux types d'atomes de silicium. Des analyses structurales par RMN du silicium-29 comparant trois formulations de xérogels sont disponibles en annexe 173. [3]

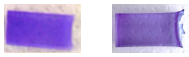
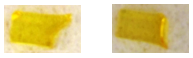
- Ponts siloxanes Si-O-Si
- Groupements silanols Si-OH
  - Silanols isolés ou libres
  - Silanols vicinaux ou pontant
  - Silanols géminés

Ces différents types de silanols confèrent au matériau des propriétés d'interaction entre la silice et les composés piégés dans les pores.

Le tableau II.3 montre la coloration prise par les xérogels en fonction de la molécule sonde et du précurseur fonctionnalisé employé. Il est à noter que les couleurs sont identiques pour l'ABTES et l'APTES, ce qui est cohérent avec le fait qu'ils portent tous deux un groupement amine.

3. Ces caractérisations ont été menées en collaboration avec le laboratoire de chimie de l'ENS-Lyon.

Au sein de la matrice TMOS, les indicateurs colorés sont en présence de silanols et d'eau adsorbée en surface de pores ou libre piégée dans les pores. La couleur prise par les indicateurs colorés indique un pH_{eq} compris entre 2,8 et 4,6. Lors de la synthèse, les groupements alkoxydes du précurseur TMOS sont hydrolysés, ce qui conduit à un pH acide. Des études RMN ont montré que les alkoxydes hydrolysés étaient majoritairement de type Q2 et Q3. [54] La présence d'alkoydes hydrolysés au sein des pores explique un pH équivalent acide.

	BBP	BBT	BT	
ABTES ou APTES				
pH_{eq}	>4,6	>7,6	[2,8 ;8]	$pH_{eq} \in$ [7,6 ;8]
n-butyl				
pH_{eq}	<3	[0 ;6]	[1,2 ;2,8]	$pH_{eq} \in$ [1,2 ;2,8]
TMOS				
pH_{eq}	<3	[0 ;6]	[2,8 ;8]	$pH_{eq} \in$ [2,8 ;3]

Tab. II.3 – **Evaluation du pH équivalent** des xérogels par indicateurs colorimétriques internes.Les interactions acido-basiques de Brønsted sont détaillées p.78

Les groupements fonctionnels apportés par les précurseurs fonctionnalisés se concentrent en surface des pores modifiant considérablement leurs propriétés.

Au sein des formulations ABTES et APTES, les pores contiennent, en plus des silanols, des groupements amine accepteurs de protons. Ceux-ci modifient donc en partie l'environnement et les silanols. Les couleurs prises par les monolithes correspondraient en milieu liquide à un pH compris entre 7 et 8.

La formulation n-butyl porte une chaine alkyle donc apporte un caractère hydrophobe modifiant l'environnement des pores. Les xérogels présentent des couleurs correspondant en milieu liquide à un pH compris entre 1,2 et 2,8, caractéristique de la silice.

Afin de contrôler les gammes de valeurs obtenues précédemment, une seconde méthode sans inclusion d'indicateur coloré a été testée.

Détermination du pH équivalent des xérogels par capture d'un COV

Pour évaluer ce pH sans avoir recours à un indicateur coloré interne à la matrice, la méthode suivante a été proposée. [63] Le 4-nitrophénol (4-NP) bactérien exogène est un COV intéressant car intrinsèquement coloré. Il absorbe à 318 nm ($\varepsilon_{\ liquide}$= 8300

L.mol^{-1}.cm^{-1}) sous forme moléculaire et à 401 nm ($\varepsilon_{\ liquide}$ = 18100 L.mol^{-1}.cm^{-1}) sous forme déprotonée. Quant à lui, le pKa du 4-NP est de 7,5. La forme moléculaire prise par le 4-NP piégé au sein d'un xérogel permet alors d'évaluer le pH équivalent. Les xérogels de quatre formulations, TMOS, TMOS/n-butyl$_{1/0,03}$, TMOS/ABTES$_{1/0,03}$ et TMOS/ABTES$_{1/0,12}$, sont exposés 1 h à la phase vapeur au-dessus d'une solution de 4-NP à 10^{-3} mol.L^{-1}.

Estimation pH équivalent à partir d'une analyse visuelle des spectres d'absorbance

La figure II.4 présente les spectres d'absorbance issus de cette exposition. Au sein de la matrice TMOS seule ainsi que dans le xérogel ayant le n-butyl comme précurseur fonctionnalisé, le 4-NP est sous sa forme moléculaire. Le pH équivalent est donc inférieur au pKa du 4-NP soit inférieur à 7,5. La présence du groupement aminé favorise nettement l'absorption de la forme déprotonée. Le xérogel TMOS/ABTES$_{1/0,03}$ présente les deux formes, le pH équivalent est donc proche de 7,5. Le xérogel ABTES$_{0,12}$ piège le 4-NP uniquement sous sa forme déprotonée, le pH équivalent est donc supérieur au pKa du 4-nitrophénol. Ces résultats donnent des gammes de pH similaires à celles apportées par la détermination avec les molécules sondes.

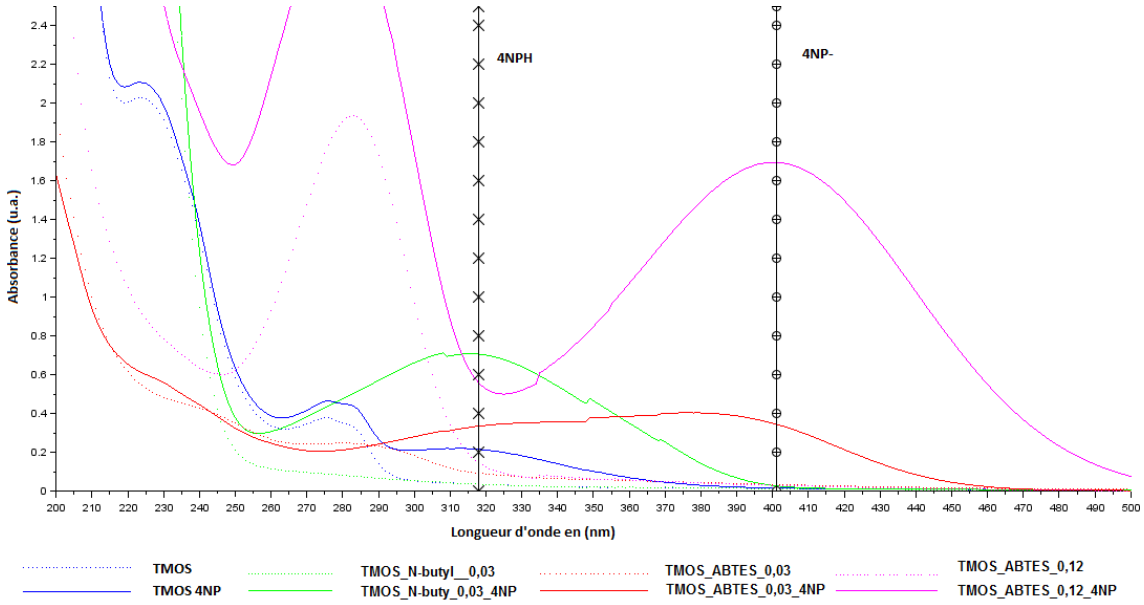


Fig. II.4 – **Influence de la fonctionnalisation du xérogel sur la forme prise par le 4-NP au sein des pores.** Dans une matrice TMOS (Bleu) la bande d'absorbance du 4-NP correspond à sa forme protonée : pH$_{eq}$ $\leq$ 7,5. De même au sein d'un xérogel TMOS/Nbutyl$_{1/0,03}$ (Vert), le 4-NP est sous forme protonée : pH$_{eq}$ $\leq$ 7,5. A l'inverse au sein d'un xérogel TMOS/ABTES$_{1/0,12}$ (Rose) pH$_{eq}$ $\geq$ 7,5, le 4-NP est sous sa forme déprotonée. La formulation TMOS/ABTES$_{1/0,03}$ conduit à une large bande d'absorbance contenant les longueurs d'onde d'absorbance des deux formes : pH$_{eq}$ $\sim$ 7,5.

Déconvolution des spectres d'absorbance et calcul du pH équivalent

A partir de ces courbes, la concentration de chaque forme du 4-NP est calculée. Pour cela le ratio des deux formes du 4-NP est estimé selon la méthodologie suivante.

La ligne de base d'absorbance intrinsèque de chaque xérogel est soustraite au spectre après exposition au 4-NP. Après déconvolution des deux pics, nous évaluons le ratio de 4-NP, donc la concentration de ces deux formes, en normalisant l'absorbance par le coefficient d'extinction molaire correspondant ainsi que par l'épaisseur des xérogels (2 mm) (II.4). Il est à noter que pour la suite des calculs, nous faisons l'hypothèse que les coefficients d'extinction (4-NP$^-$ et 4-NPH) au sein de la solution aqueuse intra-pore des xérogels sont similaires à ceux mesurés en solution aqueuse standard.

Le pH équivalent des xérogels est évalué par l'équation II.2. Les concentrations sont calculées par la loi de Beer-Lambert (Equation II.1), considérant l = 2 mm, $\varepsilon_{\ 4NPH} = 8\ 300$ et $\varepsilon_{\ 4NP-} = 18\ 100$ L.mol^{-1}.cm^{-1}.

$$DO_\lambda = \varepsilon_\lambda.[4NP]_\lambda.l \qquad \text{(II.1)} \qquad pH_{eq} = pK_a + log\frac{[4-NP^-]}{[4-NPH]} \qquad \text{(II.2)}$$

Les résultats sont regroupés dans le tableau II.4. Dans le cas des xérogels TMOS et n-butyl, les pH équivalents sont plus élevés que ceux évalués par colorimétrie. Pour les formulations ABTES, les pH équivalents sont plus faibles que les pH équivalents colorimétriques. La mesure des densités optiques, notamment à 318 nm, peut être considérée comme litigieuse, du fait que l'absorbance n'est pas pleinement imputable à l'une ou l'autre des formes du 4-NP. Ce qui montre les limites de cette méthode.

	λ^1_{max} nm	λ^2_{max} nm	DO_{318nm}	DO_{401nm}	[4-NPH$_{xerogel}$] mol.L^{-1}	[4-NPH$^-_{xerogel}$] mol.L^{-1}	pH$_{eq}$
TMOS	314		0,216	0,017	$1{,}30.10^{-4}$	$7{,}76.10^{-6}$	5,7
n-butyl$_{0,03}$	308		0,707	0,029	$4{,}26.10^{-4}$	$8{,}00.10^{-6}$	5,42
ABTES$_{0,03}$			0,336	0,346	$2{,}02.10^{-4}$	$9{,}56.10^{-5}$	6,8
ABTES$_{0,12}$		400	0,559	1,696	$3{,}37.10^{-4}$	$4{,}68.10^{-4}$	7,3

Tab. II.4 – Evaluation du pH équivalent des xérogels par indicateur colorimétrique externe

Ce mode de détermination du pH équivalent reste fonction des molécules piégées au sein des pores. Pour aboutir à une évaluation plus fine, il serait nécessaire d'effectuer des analyses similaires avec d'autres composés volatils. Par ailleurs, si l'exposition avait été plus longue, il n'est pas sûr que nous aurions eu les mêmes résultats. En effet, en une heure la diffusion du COV n'a pas pu atteindre le cœur du monolithe. L'équilibre moléculaire du COV au sein des pores du xérogel n'est pas effectif. Il serait intéressant de reconduire la mesure après une semaine d'exposition et de comparer les résultats. Cette

notion d'équilibre au sein du xérogel pose la question de la diffusion des COV et du transfert de matière en général au sein des xérogels (cf. p46).

Limites de la détermination du pH équivalent

L'incorporation de molécules sondes comme indicateur pH au sein des matrices modifie la nature du xérogel. Les photos du tableau II.3 montrent ainsi des xérogels partiellement fragmentés dans le cas d'une incorporation d'indicateur coloré dans une matrice sans précurseur fonctionnalisé. A l'échelle nanométrique, d'autres limites apparaissent. D'une part, il existe une échelle à partir de laquelle les phénomènes dus à la monocouche d'eau liée ne sont plus négligeables. En effet, dans l'eau libre, l'autoprotolyse de l'eau a bien lieu, donc tant que l'eau libre reste fortement majoritaire la notion de pH est pertinente. Le comportement des molécules d'eau est, par contre, extrêmement modifié lorsqu'il s'agit d'eau liée. Le ratio eau libre / eau liée au sein d'un pore dépend du diamètre de celui-ci. D'autre part, il y a statistiquement quelques molécules sondes colorées dans le volume d'un pore, si ce nombre de molécules pHmétriques est de l'ordre du nombre de molécules d'eau libre. Un effet de tampon des molécules sonde sur leur environnement va entrer en jeu.

L'utilisation d'un indicateur post-synthèse apparait comme une alternative. Cependant, il convient là encore d'être prudent. En effet, la détermination du pH équivalent ne repose que sur le ratio $\frac{forme-basique}{forme-acide}$. Or la concentration des deux espèces est évaluée par déconvolution des pics d'absorbance, traitement mathématique restant soumis à l'interprétation de l'expérimentateur.

Le pH équivalent est donc bien un outil qui apporte des indications utiles sur le plan applicatif mais qui n'est pas rigoureux. Il permet d'appréhender le compromis entre compréhension du matériau et pragmatisme opérationnel.

L'eau étant un élément omniprésent au sein des pores, il est intéressant d'estimer le nombre moyen de molécules d'eau au sein d'un pore.

Pour estimer grossièrement la proportion d'eau liée au sein des pores, ceux-ci sont schématisés par une sphère de rayon d, contenant une monocouche d'eau liée (Figure II.5 a et b). Une molécule d'eau est considérée comme une sphère ayant un rayon de 0,9 Å (Figure c).

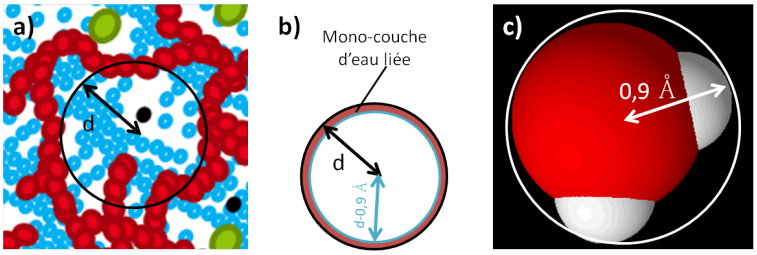


Fig. II.5 – Modèle d'étude : Une molécule d'eau est considérée comme une sphère ayant un rayon de 0,9 Å

Les caractérisations, détaillées plus loin dans ce chapitre, nous ont permis de déterminer que le diamètre des pores varie d'une dizaine à d'une centaine d'Angstrom. Le tableau II.5 évalue la proportion d'eau liée en fonction de la taille de pore.

R_{pores}	$R_{Sphere_{eau_{libre}}}$	Nombre de molécules d'eau liée	Nombre de molécules d'eau libre	Proportion d'eau liée
50 Å	49,1 Å	9094	162 394	0,05
20 Å	19,1 Å	1 441	9 558	0,15
10 Å	9,1 Å	344	1 034	0,25
5 Å	4,1 Å	78	95	0,45

Tab. II.5 – Estimation de la proportion d'eau liée dans les pores

Pour les pores les plus petits de nos matériaux, il apparait que la quantité d'eau liée n'est pas négligeable. Le comportement global des molécules d'eau est modifié. En effet, les molécules de la monocouche liée à la surface sont beaucoup moins mobiles que les molécules d'eau libre.

Cette estimation numérique est cohérente avec les valeurs apportées par la littérature.

L'accumulation de COV au sein d'un xérogel repose sur la capacité des molécules captées à diffuser au sein des matériaux. Aussi la diffusion de COV au sein de trois types de sol-gels a été étudiée.

II.1.4 Diffusion des COV au sein de matériau sol-gel

La figure II.6 illustre la diffusion des COV au sein d'échantillons de xérogels dans trois formulations :

— TMOS/ABTES ⇒ Détection sans sonde du 4-NP
— TMOS/n-butyl BBP ⇒ Détection avec sonde pH-métrique peu spécifique
— TEOS/n-butyl/HCl/DMACA ⇒ Détection avec sonde spécifique de l'indole

Pour ce faire une partie du xérogel est protégé de l'exposition contrairement à l'autre extrémité du monolithe. Le temps d'homogénéisation est ensuite observé hors de la présence de tout gaz extérieur au matériau.

Ces trois formulations possèdent des cinétiques de gélification très différentes, de l'ordre de la minute pour la première, de la journée pour la deuxième, et de la semaine pour la troisième. Les molécules d'indole et de 4-NP ont des tailles similaires.

Le premier mode de détection est une simple capture du COV sans liaison. Le groupement fonctionnel aminé influençant juste la forme moléculaire du COV au sein des pores. Le temps de diffusion du gaz à l'intérieur du xérogel est de deux jours. Le second mode de détection met en jeu des interactions faibles. Tandis que le troisième mode se base sur une interaction spécifique sonde-cible irréversible.

Malgré ces différences dans la stratégie de détection, il commence à apparaitre que plus le temps de gélification est long, plus la diffusion des COV dans le xérogel demande du temps. Or la nanofluidique montre, qu'à l'échelle des fluides confinés, la viscosité est considérablement accrue près des parois. [69] De fait, les matériaux ayant les plus petits pores sont extrêmement défavorables à la diffusion.

La diffusion au sein des sol-gels TEOS apparait beaucoup plus longue que dans un capteur TMOS.

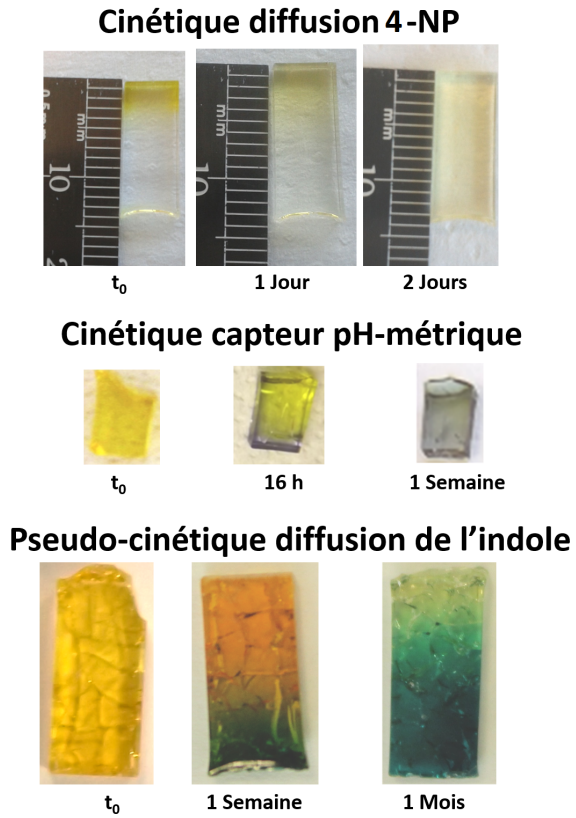


Fig. II.6 – **Diffusion de COV à l'intérieur de monolithes sol-gel de formulations différentes**

II.1.5 Développement de formulations éthanoliques

Les formulations de xérogels historiquement développées utilisent le TMOS, comme silane principal. En effet, comme le montre l'étude précédente la diffusion d'un COV est plus rapide au sein d'un sol-gel TMOS que dans un sol-gel TEOS. Or le TMOS est classé comme produit cancérogène, mutagène et reprotoxique par l'Institut national de recherche et de sécurité (INRS), puisqu'il libère lors de son hydrolyse du méthanol, lui-même un CMR notoire. La réglementation insiste de plus en plus fortement sur la nécessité de substituer les produits toxiques par des équivalents moins nocifs. Des travaux ont été menés dans ce sens. L'objectif est ici de remplacer le TMOS par du TEOS, ce dernier libérant de l'éthanol lors de son hydrolyse, il n'est pas un CMR.

Le TEOS n'avait pas été sélectionné initialement car les propriétés mécaniques et optiques obtenues après synthèse selon le protocole conventionnel n'étaient pas optimales. Une première série de tests a été menée en interne par Arnaud LEMELLE afin de mettre en œuvre cette substitution. Des xérogels possédant de bonnes tenues mécaniques ont été obtenus. Cependant, ces matériaux présentaient une certaine opacité. Il a néanmoins pu être utilisé dans le cadre d'une détection colorimétrique visuelle de mercaptan avec réaction sonde/cible.

En repartant de ces travaux, des formulations ont été testées et mises au point pour les différents modes de transductions. Elles seront développées au cours des chapitres correspondants.

II.2 Caractérisation des xérogels par diffusion des rayons X aux petits angles

La diffusion des rayons X aux petits angles, abrégée SAXS pour Small Angle X-rays Scattering, est une méthode de caractérisation structurale des matériaux. L'objectif de ces caractérisations par SAXS est d'analyser différentes séries de xérogels, afin de répondre à nos questionnements sur la structure de nos matériaux et l'impact des différents paramètres affectant les productions de xérogel.

Des tests préliminaires avaient été réalisés en interne, en 2013, sur des xérogels de silices mésoporeuses (Figure II.7). Il avait été possible de mettre en évidence des courbes de diffusion différentes selon l'aspect des matériaux transparents ou opaques. Il apparait donc possible de procéder à une analyse fine du matériau *via* cette méthode de caractérisation.

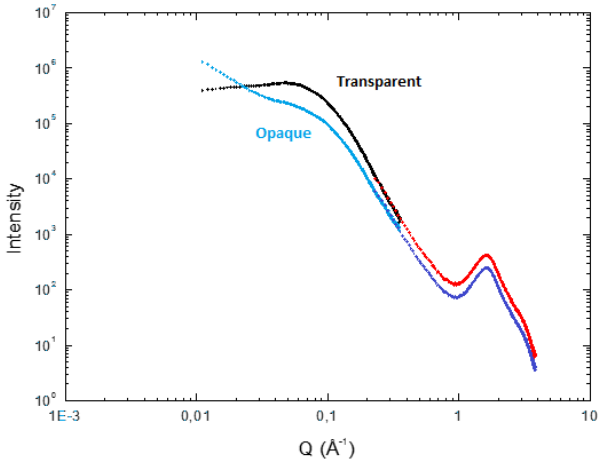


Fig. II.7 – Courbes de diffusion de deux xérogels TMOS/ABTES$_{1/0,03}$. L'opacité et la transparence de ce matériau se traduisent par des courbes de diffusions distinctes. L'intensité du signal est fonction de la densité électronique du matériaux (cf. p51).

II.2.1 Quelques notions de SAXS

Les analyses par diffraction des rayons X classiques explorent des distances de type inter-plan atomique de l'ordre de l'Angstrœm. Dans le cas de la diffusion SAXS, l'échelle étudiée est beaucoup plus grande, allant du nanomètre à la centaine de nanomètres. L'intérêt est, en effet, porté sur l'organisation de la matière à une échelle non locale.

La méthode d'analyse consiste à exprimer l'intensité diffusée en fonction du vecteur de diffusion Q [4]. Mathématiquement l'intensité diffusée s'obtient par la transformée de Fourier de la fonction de corrélation de la densité électronique de l'échantillon. Les analyse SAXS reposent donc sur le contraste des densités électroniques des différentes phases présentes au sein d'un échantillon. [70] Dans notre cas il devrait donc être possible de distinguer la silice des pores. Les méthodes SAXS permettent d'explorer un domaine allant de 10^{-4} Å^{-1} à 10^{-1} Å^{-1}. Selon l'échelle observée, il est possible d'accéder à trois types de propriétés structurales :

Domaine des « grands » Q [5] (10^{-1} Å^{-1} à 10^{-2} Å^{-1}) : structure de la surface des particules étudiées et porosité

Domaine des Q « intermédiaires » (10^{-2} Å^{-1} à 10^{-3} Å^{-1}) : taille, morphologie et structure interne des particules.

Domaine des « petits » Q (10^{-3} Å^{-1} à 10^{-4} Å^{-1}) : distances et interactions entre particules.

La figure II.8 récapitule de façon simpliste, les informations disponibles sur une courbe de diffusion SAXS selon l'échelle d'observation.

4. Le vecteur de diffusion Q est proportionnel à l'inverse de la longueur d'onde selon l'équation $Q = \frac{4.\pi}{\lambda}.sin\frac{\theta}{2}$ où θ est l'angle de diffusion et λ la longueur d'onde. Travailler dans cet espace en Å^{-1} permet de dilater les échelles aux petits angles et d'observer des comportements intéressants à l'échelle de la structure du matériau

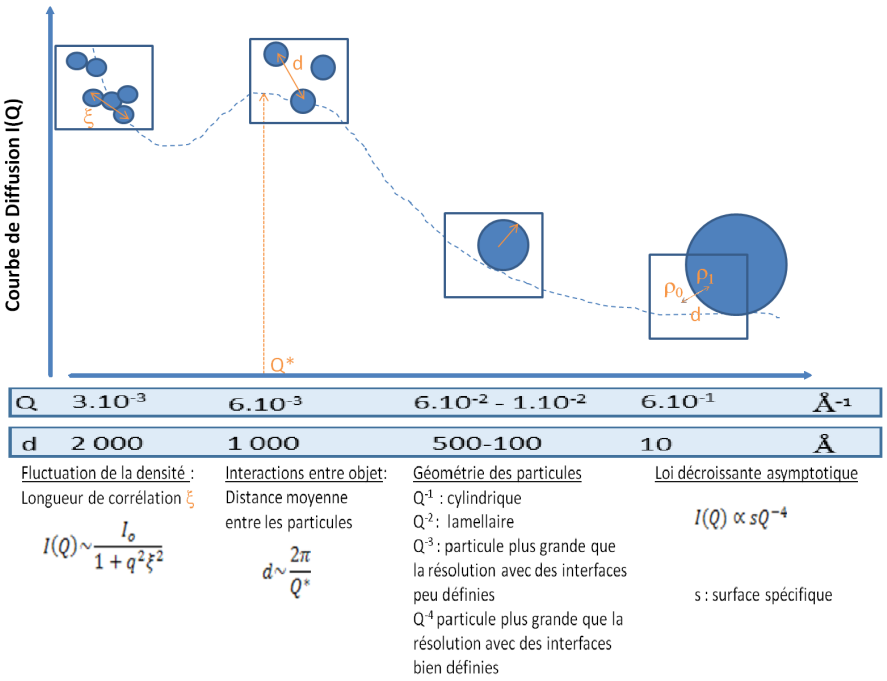


Fig. II.8 – **Schéma général d'interprétation : exemple de suspension colloïdale.** [71] L'analyse des courbes de diffusion aux différentes échelles de la matière permet d'obtenir différentes informations et caractéristiques de l'échantillon. Les valeurs en Q^{-n} associées aux interprétations des formes correspondent aux valeurs de la pente de la courbe de diffusion lors de représentation logarithmique de l'intensité I(Q)

.

Pour mieux comprendre les notions d'interface définie ou peu définie présentées figure II.8, il faut considérer l'interface du point de vue de la densité électronique. La figure II.9 présente le passage d'une phase de densité électronique ρ_0 à une phase de densité électronique ρ_1 ($\rho_o > \rho_1$). Cette transition peut être nette (l'interface entre deux phases sera bien définie) ou progressive (l'interface entre les deux phases sera moins bien définie, voire floue). Cette description bien que qualitative permet de comparer les matériaux entre eux.

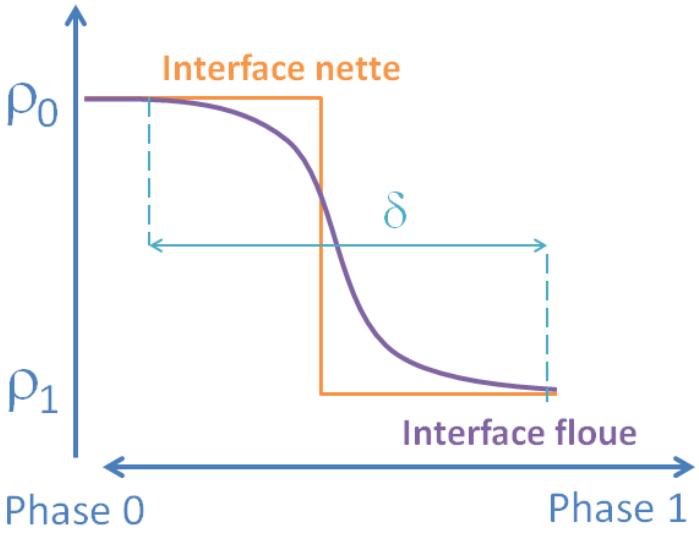


Fig. II.9 – **L'interface entre deux phases d'un matériau se caractérise par un changement de densité électronique.** La distance de transition delta entre la phase pure d'un composé et la phase pure du second composé caractérise la netteté de l'interface. Plus delta est petite plus l'interface est franche, il s'agit donc là encore d'une question d'échelle d'observation.

L'analyse des différents régimes permet de remonter aux caractéristiques de l'échantillon et ainsi d'émettre des hypothèses sur sa structure.

La pente de courbe de diffusion représentée en échelle logarithmique est associée à la forme des porosités et permet de caractériser l'interface. La pente de cette courbe de diffusion aux alentours de 10^{-1} Å apporte des informations sur la présence et la nature des interfaces à l'échelle observée. Les pentes en Q^{-4} correspondent à un changement brutale de densité électronique entre les deux phases c'est-à-dire à des interfaces bien définies. Il s'agit d'interfaces d'objets (particules ou pores) dont le rayon est supérieur à l'échelle observée. La distance de transition δ est largement inférieure aux dimensions de l'objet. Les pentes en Q^{-3} correspondent à des interfaces plus floues. La séparation entre les deux phases est moins bien définie. La présence d'interfaces témoigne de la présence de pores aux échelles supérieures à celles observées, mais la distance δ est moins faible par rapport aux dimensions des objets que dans le cas de pentes en Q^{-4}. Lorsque la pente est en Q^{-2} ou Q^{-1}, la porosité est assimilée à un ensemble lamellaire. Dans le cas de sol-gel le terme lamellaire pose question, n'ayant pas de sens *a priori* dans un xérogel. Ces valeurs de pente peuvent donc être interprétées comme le signe d'une porosité fractale, dont les grandeurs caractéristiques sont proches des distances caractéristiques à laquelle se déroule l'analyse.

L'analyse par SAXS permet de recueillir l'intensité diffusée en fonction du vecteur de diffusion (Q). Les données peuvent être mise en forme selon deux types de graphiques. Regarder l'allure des courbes de diffusion selon une échelle logarithmique apporte des informations sur l'interface des porosités. Il est aussi possible d'étudier directement l'intensité en fonction du vecteur de diffusion. L'information est apportée par Q_{max} correspondant

à la valeur de l'intensité I(Q) la plus grande. La valeur de Q_{max} permet de remonter à la distance moyenne inter-objet. Plus Q_{max} augmente, plus la distance moyenne inter-pore diminue, donc plus le nombre d'objet au sein du volume augmente.

Les mesures présentées ci-dessous ont été effectuées au sein du laboratoire de l'institut INAC, sous la direction d'Arnaud DE GEYER.

La connaissance de la géométrie des pores revêt un intérêt particulier pour des méthodes de caractérisations complémentaires. Lors du calcul des distributions de la taille des pores à partir des isothermes issues de l'adsorption-désorption d'azote par la théorie fonctionnelle de la densité, une hypothèse est faite sur la géométrie de la porosité. Connaitre au préalable les formes des pores serait donc un atout pour sélectionner les modèles de traitement.

L'objectif est ici d'étudier le comportement des courbes de diffusion de matrices TMOS et de matrices TEOS (synthétisées selon les protocoles présentés en annexe page 167). Ces sol-gels diffèrent par la nature de leurs précurseurs principaux. Leurs propriétés chimiques et réactives imposent des protocoles de synthèse différents (avec pré-hydrolyse dans le cas des TEOS) l'organisation des deux réseaux d'oxyde est donc *a priori* distincte. Il s'agit donc d'observer si de telles différences conduisent à une signature différente par analyse SAXS.

II.2.2 Analyses de formulations TMOS et TEOS sans précurseur fonctionnalisé

La figure II.10 présente les courbes de diffusion obtenues par analyse SAXS de xérogels TMOS et TEOS, lorsque le faisceau d'analyse cible le cœur du monolithe. La figure II.10–a correspond à la représentation logarithmique permettant de visualiser la pente en Q^{-n}. La figure II.10–b représente l'intensité en échelle linéaire, elle permet de déterminer Q_{max}.

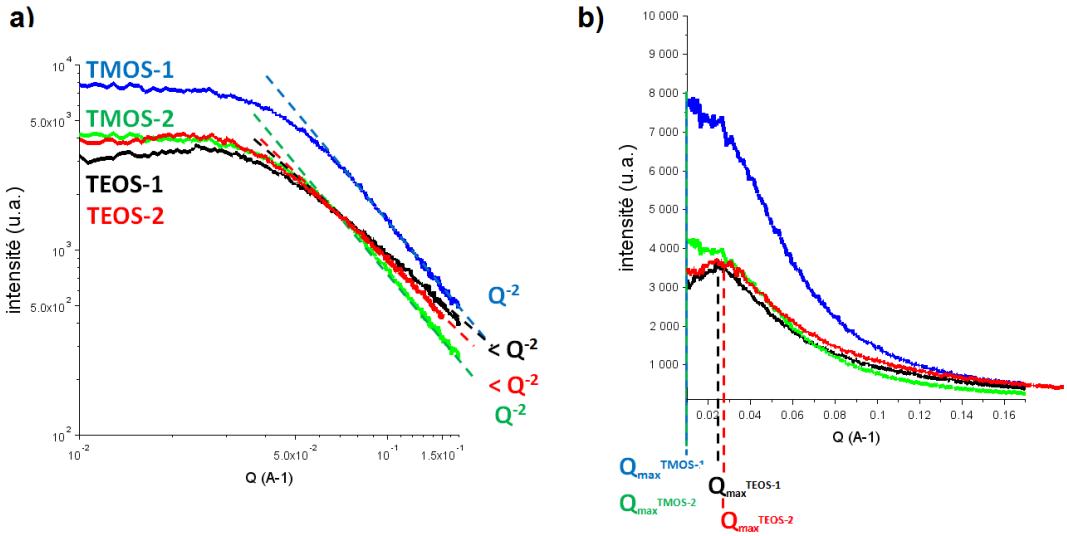


Fig. II.10 – Courbes de diffusions de xérogels TMOS et TEOS. a) Représentation log-log : les pentes sont de l'ordre de Q^{-2}. b) Intensité en échelle linéaire : détermination de Q_{max}

Analyse de la figure II.10–a :

L'information recherchée est la valeur de la pente dans le domaine des grandes valeurs de Q. Pour les échantillons TMOS, elles sont de l'ordre de Q^{-2} tandis qu'elles sont comprises entre Q^{-1} et Q^{-2} pour les TEOS.

L'absence de pente en Q^{-3}et Q^{-4} témoigne de l'absence d'interface liée à des pores de diamètre supérieur à l'échelle observée. Les matériaux ne présentent donc pas de pores supérieurs à la centaine d'Angstrom. Ce que confirme la distribution de tailles de pores caractéristique de formulations TMOS présentée figure II.11.

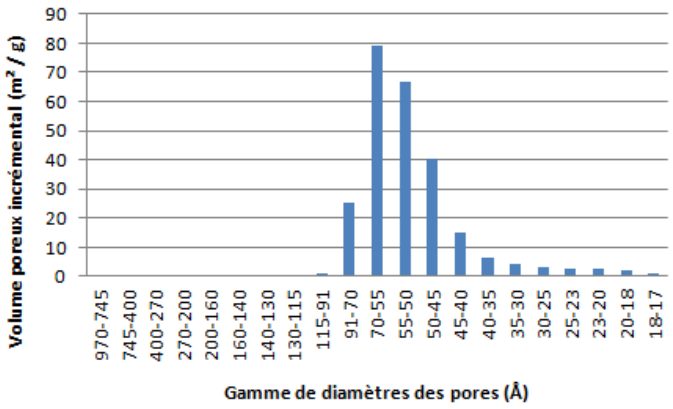


Fig. II.11 – **Distribution de la taille des pores d'une formulation TMOS de surface spécifique 270 $m^2.g^{-1}$** d'après la méthode de Brunauer, Emmet et Teller (BET). La porosité,déterminée *via* la théorie de la fonctionnelle de densité (DFT), est comprise entre une vingtaine et une centaine d'Angstrom. [59]

Les pentes en Q^{-2} apparaissent donc liées à de la micro ou de la méso porosité.

Analyse de la figure II.10–b :

Ce mode de représentation permet de repérer la valeur de Q nommée Q_{max} pour laquelle l'intensité est maximale. Ces valeurs sont plus faibles (∼0,015 Å $^{-1}$, ie. 66 Å) pour les formulations TMOS que pour les formulations TEOS (∼0,025 Å $^{-1}$, ie. 40 Å). La distance inter-pores apparait donc plus grande au sein des formulations TMOS qu'au sein des formulations TEOS.

Interprétation de l'intensité I(Q)

Pour des échantillons fins de l'ordre 100 µm d'épaisseur, l'intensité traduit le nombre de pores. Dans le cas des échantillons monolithiques, il n'aurait pas été pertinent d'étudier des matériaux si minces puisqu'ils ne refléteraient pas la réalité des matériaux utilisés (e = 800 µm à 2 mm). Le signal reçu par le récepteur est d'autant plus faible que l'épaisseur du matériau est importante. Pour s'affranchir de ce biais, le signal a été normalisé par l'épaisseur du matériau. [72] La mesure de l'épaisseur de l'échantillon influence donc l'intensité représentée figure II.10 et impose la prudence. Il apparait que l'échantillon TMOS-1 est probablement plus poreux que l'échantillon TMOS-2. Les deux échantillons TEOS sont eux semblables. Les analyses précédentes ont montré une légère différence entre les deux formulations et une unité de comportement au sein d'une formulation. Le faisceau d'analyse couvrant une surface inférieure au < 1 mm ^{2}, il a été possible de cibler d'autres parties du monolithe afin d'étudier son homogénéité.

Homogénéité au sein d'un monolithe

Afin d'évaluer l'homogénéité au sein d'un monolithe, des courbes de diffusion sont enregistrées en différents points d'un même monolithe. Comme présenté sur le schéma II.12, P1 correspond à la zone de ménisque présentée par les matériaux, le point P2 au cœur du matériau, et enfin le point P3 au pied du matériau.

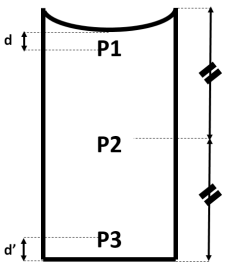


Fig. II.12 – Schéma type d'un xérogel. Les points P1, P2 et P3 correspondent aux différentes zones d'un même xérogel qu'il a été possible de caractériser par SAXS. d ≃ d' ≃ 2 mm

Le tableau II.6 regroupe les différentes caractéristiques obtenues.

Pour l'ensemble des mesures, la pente correspond à une structure pour laquelle la porosité est inférieure à la centaine d'angströms. Pour les formulations TEOS, les trois positions sont homogènes au sein des monolithes. Dans le cas des formulations TMOS la position P1 se détache des deux autres. Il apparait que près du ménisque, la distance intra-pores diminue par rapport aux distances intra-pores dans le reste du matériau.

	Position	Pentes	Q_{max} Å $^{-1}$.
TMOS-1	P1	$< Q^{-2}$	0,024
	P2	Q^{-2}	0,01
	P3	Q^{-2}	0,01
TMOS-2	P1	$< Q^{-2}$	0,026
	P2	Q^{-2}	0,01
	P3	Q^{-2}	0,01
TEOS-1	P1	$< Q^{-2}$	0,025
	P2	$< Q^{-2}$	0,026
	P3	$< Q^{-2}$	0,025
TEOS-2	P1	$< Q^{-2}$	0,027
	P2	$< Q^{-2}$	0,024
	P3	$< Q^{-2}$	0,025

Tab. II.6 – Pentes et Q_{max} obtenus en trois positions différentes des xérogels

L'étude des **matrices TMOS et TEOS sans précurseur fonctionnalisé** montre que ces formulations, différentes par la nature de leur précurseur principal et leur protocole de synthèse, conduisent à des comportements certes **distincts mais néanmoins proches**. Leur pente sont **de l'ordre de Q^{-2}**, attribuables à de la **micro et/ou méso-porosité**.

Par ailleurs, un **comportement particulier** a pu être mis en évidence près du **ménisque** pour les **formulations TMOS**. En effet, la pente des courbes de diffusion est plus faible près du ménisque que dans le cœur du matériau. La distance entre les pores y est également plus faible.

II.2.3 Analyses de formulations TMOS et TEOS contenant un précurseur fonctionnalisé

D'un point de vue purement applicatif, les formulations les plus utilisées sont les TMOS-ABTES. En effet, ces xérogels combinent trois critères majeurs de notre cahier des charges : bonne tenue mécanique, bonne cinétique de détection de COV en absorbance sans sonde (notamment du 2-NP) et temps de production court ($t_{gelification} < 5$ mn ; $t_{sechage}$: 5 jours). C'est donc sur cette gamme de xérogels que l'étude complète a été réalisée. Des xérogels TMOS–ABTES produits par la société Ethera [73] ont également été analysés. Les formulations TMOS/N-buyl ($t_{gelification}$ <1 jour ; $t_{sechage}$: 10 jours) et TEOS n'ont été caractérisées que pour certains pourcentages de précurseur fonctionnalisé. De plus leur vitesse de gélification étant faible, le séchage sous hotte qui n'est pas utilisé pour ces formations n'a pas été étudié. Les conditions de séchage de ces deux derniers échantillons sont contrôlées mais inconnues. La figure II.13 récapitule les différents lots et leur mode de séchage..

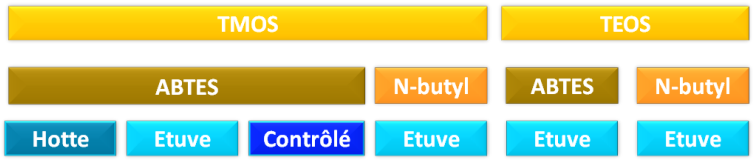


Fig. II.13 – Caractérisation des formulations TMOS et TEOS sans précurseur fonctionnalisé

Les courbes de diffusion sont disponibles en annexe tandis que la tableau II.7 regroupe l'ensemble les valeurs des pentes et des Q^{-3}. La figure II.14 illustre les résultats obtenus pour le lot de xérogels TMOS-ABTES séchés sous hotte.

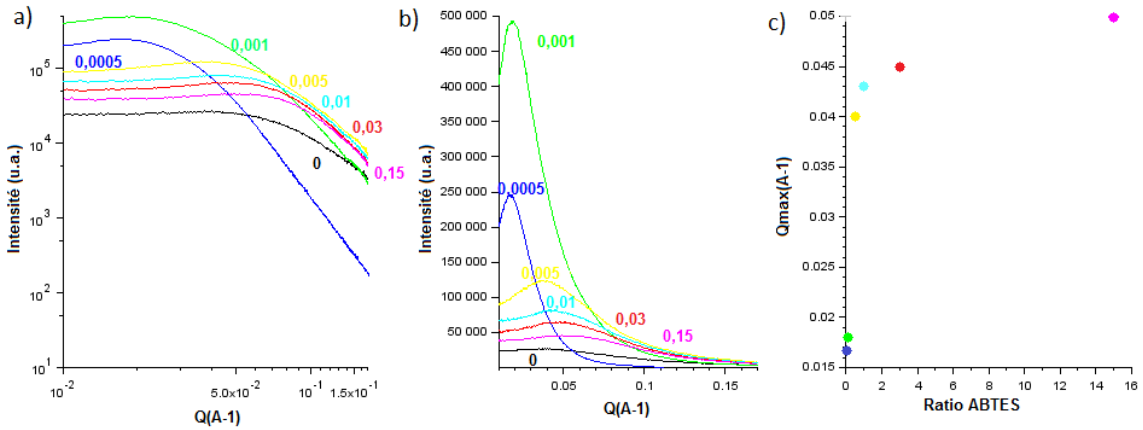


Fig. II.14 – **Courbe de diffusion pour la gamme TMOS-ABTES séchés sous hotte.** a) Représentation logarithmique : les pentes sont de l'ordre de Q^{-3}. b) Intensité en échelle linéaire : les valeurs de Q_{max} indiquent que la distance inter-pores diminue avec la quantité de précurseur fonctionnalisé. c) Vecteur de diffusion correspondant à l'intensité maximum en fonction du ratio d'ABTES

Intensité des courbes de diffusion

Les courbes de diffusions des xérogels TEOS se superposent. L'ajout de précurseur fonctionnalisé ne modifie pas l'intensité du signal. Dans le cas des xérogels TMOS/ABTES, l'inclusion de porogène augmente l'intensité. Les intensités les plus fortes sont obtenues pour les ratios d'ABTES les plus faibles, typiquement 0,001.

Dans le cas de la gamme de xérogels TMOS/ABTES séchés sous hotte (Figure II.14-b), deux comportements sont observés. Pour des ratios molaires allant de 0 à 0,001 d'ABTES, l'intensité du pic augmente avec la quantité de précurseur fonctionnalisé. Puis l'intensité du pic décroit avec la quantité de précurseur fonctionnalisé.

Analyse de la pente en Q^{-n}

Les xérogels TMOS/ABTES séchés sous hotte présentent des pentes entre Q^{-3} pour les plus forts ratios d'ABTES et Q^{-4} pour les plus faibles ratios. La tendance est identique pour les monolithes TMOS/ABTES séchés en étuve. Les deux formulations de xérogels commerciaux [6] présentent de pentes en Q^{-4}. Leurs courbes de diffusion se superposent par ailleurs parfaitement. Contrôler les conditions de séchage permet donc de favoriser une interface nette. Les xérogels TMOS/Nbutyl présentent des pentes en Q^{-3}, pour l'ensemble des ratios molaires testés. Le xérogel TEOS/$ABTES_{1/0,012}$ possède une pente en Q^{-2} tandis que les ratios supérieurs conduisent à des pentes en Q^{-3}. Les xérogels TEOS/Nbutyl présentent des pentes en Q^{-2}, pour l'ensemble de ratios molaires testés.

L'inclusion de précurseurs fonctionnalisés n'a donc pas le même impact sur les formulations TMOS que sur les formulations TEOS ayant subi une pré-hydrolyse lors de la synthèse. Dans le premier cas, l'ajout de précurseurs fonctionnalisés entraine des pentes en Q^{-3} et Q^{-4} et ce, même avec de très faibles quantités de porogènes. Alors que dans le cas des xérogels TEOS, seul l'ajout de porogène au-delà de 0,12 en ratio molaire entraine une modification de la pente.

La présence de pentes en Q^{-3} et Q^{-4} attestent que ces xérogels possèdent une porosité supérieure à la distance caractéristique, ici supérieure à la centaine d'Angstrom.

Analyse des Q_{max}

Les xérogels TEOS/ABTES possèdent des valeurs de Q_{max} entre $2{,}1.10^{-2}$ $Å^{-1}$, et $2{,}9.10^{-2}$ $Å^{-1}$, ce qui est similaire à la matrice seule.

Dans le cas des xérogels TMOS, seule la gamme TMOS/ABTES séchée sous hotte présente un comportement particulier. La figure II.14-c met en évidence un décalage de la

6. Les xérogels commerciaux ont été réalisés suivant la formulation par la société Ethera spécialisée dans la détection et la quantification de polluants chimiques, notamment les composés organiques volatils tels que le formaldéhyde ou les BTEX (Benzène, Toluène, Ethylbenzène et Xylène). [73]

valeur de Q pour laquelle le maximum en intensité est atteint avec un taux d'ABTES de 0,001. Sans précurseur fonctionnalisé, ce maximum est peu marqué et correspond à une valeur de 5.10^{-2} Å^{-1}. Pour un taux de 0,0005, le maximum est proche de 2.10^{-2} Å^{-1}, puis il migre vers les plus grandes valeurs de Q avec le ratio d'ABTES. Un déplacement vers les plus grandes valeurs de Q revient à un déplacement vers les plus petites distances. La distance inter-pores diminue.

La mise en parallèle de l'évolution de l'intensité (donc du nombre de pores) d'une part et de la diminution de la distance inter-pore d'autre part, laisse pressentir l'existence de deux régimes successifs. Pour de très faibles quantités de précurseurs fonctionnalisés, il y a augmentation du volume poreux et diminution de la distance inter-pores avec l'augmentation du taux de précurseurs fonctionnalisés. Puis au-delà d'un ratio de précurseur fonctionnalisé, il y a diminution du volume poreux global tandis que la distance inter-pores reste stable.

Ce constat est à mettre en parallèle avec l'évolution de la distribution de taille des pores, d'une gamme de xérogels TMOS/ABTES présentée en annexe (p.173). L'augmentation du ratio d'ABTES entraine une diminution du nombre de pores de 50 Å à 100 Å de diamètre, mais une augmentation du nombre de pores 15 Å à 50 Å de diamètre.

	Synthèse		Analyse SAXS	
	Séchage	Porogène	Pente	Q_{max} Å $^{-1}$
TMOS	Hotte	ABTES 0,0005	Q^{-4}	$2{,}15.10^{-2}$
TMOS	"	ABTES 0,001	Q^{-4}	$2{,}3.10^{-2}$
TMOS	"	ABTES 0,005	Q^{-3}	4.10^{-2}
TMOS	"	ABTES 0,01	Q^{-3}	$4{,}3.10^{-2}$
TMOS	"	ABTES 0,03	Q^{-3}	$4{,}5.10^{-2}$
TMOS	"	ABTES 0,15	Q^{-3}	5.10^{-2}
TMOS	Etuve	ABTES 0,00005	Q^{-4}	$2{,}2.10^{-2}$
TMOS	"	ABTES 0,0001	Q^{-4}	$1{,}7.10^{-2}$
TMOS	"	ABTES 0,001	Q^{-4}	2.10^{-2}
TMOS	"	ABTES 0,03	Q^{-3}	$< 2.10^{-2}$
TMOS	Controlé sous azote	ABTES 0,03	Q^{-4}	4.10^{-2}
TMOS	"	ABTES 0,15	Q^{-4}	4.10^{-2}
TMOS	Etuve	n-butyl 0,00001	Q^{-3}	$2{,}5.10^{-2}$
TMOS	"	n-butyl 0,0001	Q^{-3}	$3{,}3.10^{-2}$
TMOS	"	n-butyl 0,001	Q^{-3}	$2{,}9.10^{-2}$
TMOS	"	n-butyl 1%	Q^{-3}	$3{,}0.10^{-2}$
TMOS	"	n-butyl 0,03	Q^{-3}	3.10^{-2}
TMOS	"	n-butyl 0,12	Q^{-3}	$2{,}5.10^{-2}$
TMOS	"	n-butyl 0,32	Q^{-3}	$2{,}9.10^{-2}$
TEOS	Etuve	ABTES 0,012	Q^{-2}	$2{,}1.10^{-2}$
TEOS	"	ABTES 0,12	Q^{-3}	$2{,}3.10^{-2}$
TEOS	"	ABTES 0,15	Q^{-3}	$2{,}4.10^{-2}$
TEOS	Etuve	n-butyl 0,012	Q^{-2}	$2{,}4.10^{-2}$
TEOS	"	n-butyl 0,03	Q^{-2}	$2{,}6.10^{-2}$
TEOS	"	n-butyl 0,15	Q^{-2}	$2{,}7.10^{-2}$
TEOS	"	n-butyl 0,32	Q^{-2}	$2{,}9.10^{-2}$

Tab. II.7 – Pentes des représentations logarithmiques et valeurs de Q_{max} pour les différentes formulations incluant des précurseurs fonctionnalisés

II.2.4 Conclusion sur les analyses par SAXS

Les analyses par diffusion des rayons X aux petits angles ont mis en évidence la capacité de cette méthode à révéler des comportements distincts correspondant à des structures particulières au sein d'un même monolithe. Il est difficile à ce stade de l'étude de conclure plus précisément sur la nature et la géométrie de la porosité. La microscopie électronique à transmission compléterait l'analyse. Cependant, les mesures confirment d'une part que

la maitrise du procédé de gélification est le point clef du contrôle de la porosité, et d'autre part qu'au sein de formulations TMOS, l'ajout de quelques pourcentages de précurseur fonctionnalisé confère des propriétés structurales particulières.

La différence structurale entre les xérogels TMOS et TEOS a été mise en évidence par SAXS. Le type de porosité des formulations de TMOS apparait plus favorable à la capture et à la diffusion de COV. Cependant, les surfaces spécifiques développées des formulations TEOS restent importantes. Il est donc possible d'espérer une détection des COV. Par ailleurs,le TMOS libère, d'une part, du méthanol lors de son hydrolyse, ce qui en fait un CMR, d'autre part il implique un refroidissement à l'azote liquide lors des synthèses, ce qui complique la mise en œuvre des formulations.

Parvenir à mettre au point des formulations de xérogels TEOS sensibles serait donc très intéressant. L'étude suivante porte sur le transfert d'une formulation de capteur spécifique d'une formulation TMOS à une formulation TEOS.

II.3 Introduction d'une molécule sonde au sein de capteurs TEOS pour la détection des composés soufrés volatils (CSV)

Nous avons étudié des formulations TEOS capables de détecter des composés soufrés volatils (CSV) grâce à une réaction sonde-cible.

II.3.1 Pourquoi détecter des CSV ?

Comme le montre la figure (I.3 au chapitre I page 22), récapitulant les travaux de L.D.J.Bos *at* al. sur les métabolismes des pathogènes, un certain nombre de bactéries émettent des thiols au cours de leur croissance, en particulier du sulfure d'hydrogène. [38] [34] Bien que ce COV ne soit pas pleinement spécifique, il est néanmoins un très bon indicateur de la présence de *Salmonella*.

Ce pathogène est d'intérêt majeur en agroalimentaire. Il est, en effet, responsable de nombreuses toxi-infections alimentaires graves (44% des toxi-infections alimentaires déclarées en France en 2010). [74].

Les infections à *Salmonella* sont donc préoccupantes pour les agences et organismes de sécurité sanitaire et alimentaire. La principale source de contaminations des salmonelles est la viande (volailles, porcs, bovins), *via* le tube digestif des animaux, ceux-ci ne présentant généralement pas de symptômes. La transmission de l'homme peut se faire *via* un aliment contaminé ou par contact avec un animal porteur.

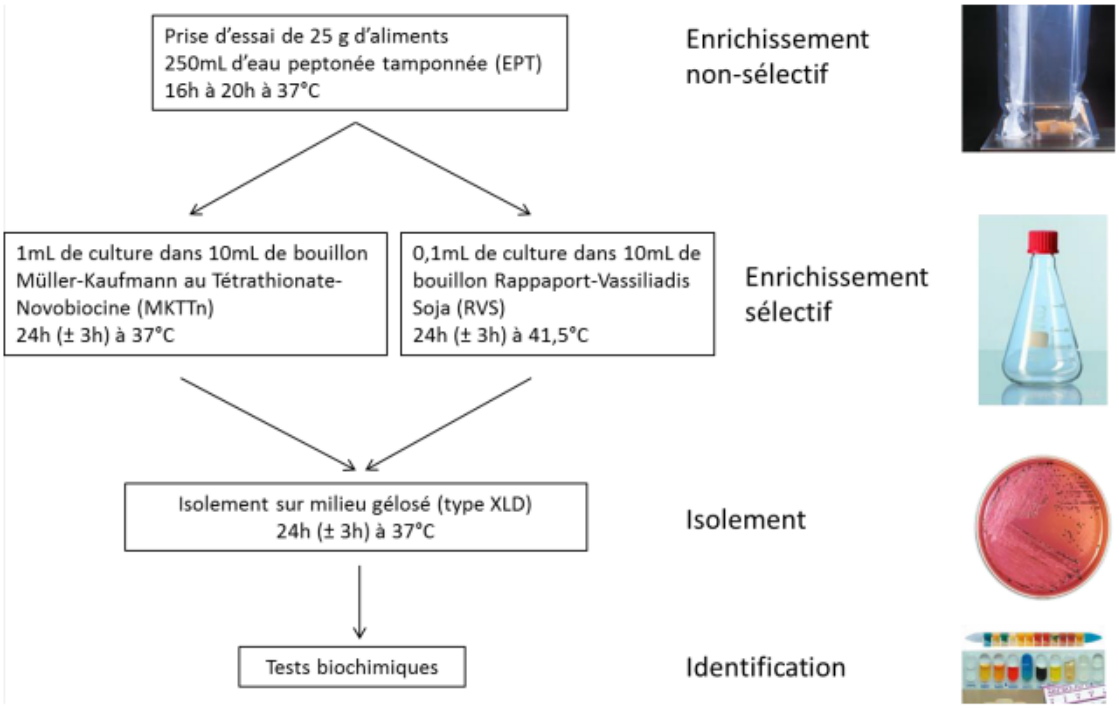


Fig. II.15 – **Norme ISO 6579, 2002 - Procédure de détection de *Salmonella***

La méthode normalisée est décrite par le protocole ISO 6579 de 2002, que récapitule la figure II.15. Cette procédure nécessite plusieurs étapes impliquant une main d'œuvre importante ainsi qu'un grand nombre de consommables. L'ensemble des échantillons subit les trois premières étapes du protocole. Ce qui conduit à un grand nombre de tests négatifs, inutiles et couteux. La production d'H_2S est une condition nécessaire mais non suffisante à la détection de *Salmonella*. La détection de ce CSV permettrait un premier tri limitant le nombre de tests à effectuer, seuls les échantillons positifs devant être analysés.

II.3.2 Réaction sonde-cible

L'acide 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoïque) (DTNB) ou réactif d'Ellman est habituellement employé pour détecter et doser les thiols par rupture d'un pont disulfure, selon la réaction présentée figure II.16. [75] [76] [77]

Le DTNB absorbe à 330 nm. Par réaction avec les alcanethiols, le pont disulfure du DTNB est clivé pour former l'acide 2-nitro-5-thiobenzoïque (TNB). Les deux formes déprotonées de cette molécule absorbent respectivement à $\lambda_{max}^{TNB^-} = 328$ nm et $\lambda_{max}^{TNB^{2-}}$=412 nm. C'est cette dernière forme qui a été préférée. Elle permet en effet la détection en absorbance et en colorimétrie. Le pKa entre les formes TNB^- et TNB^{2-} est de 4,57.

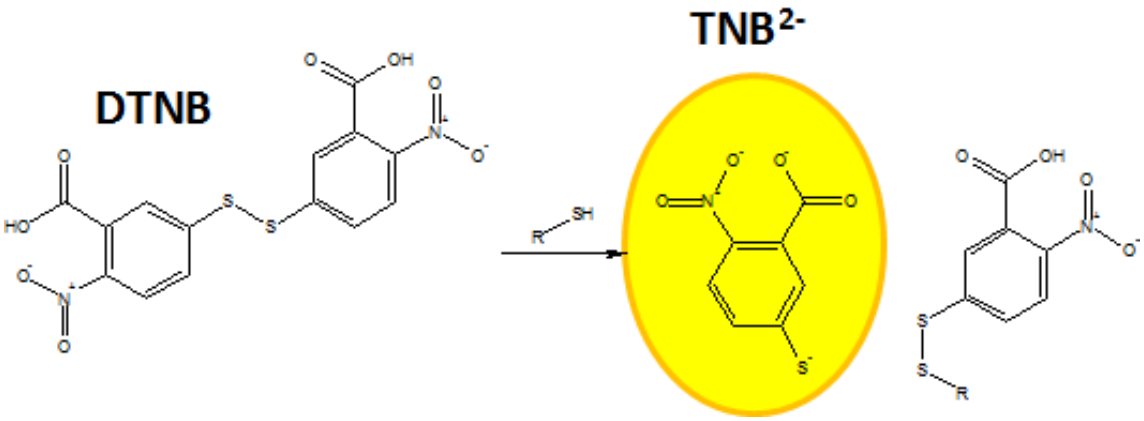


Fig. II.16 – Clivage du pont disulfure de la molécule DTNB par l'action des thiols. La rupture de la liaison forme le 3-thio-6-nitrobenzoate (TNB^-), qui se ionise sous la forme du dianion TNB^{2-} dans l'eau à pH neutre et alcalin. Cette espèce a une couleur jaune prononcée.

II.3.3 Les capteurs TMOS existants

La formulation retenue pour l'élaboration des capteurs est présentée tableau II.8. [58] La forme TNB^{2-} est favorisée à l'intérieur des pores, en ajustant la quantité d'APTES. Les limites de détections (LD) obtenues sont $LD_{2h}^{H2S} = 5$ ppm pour le sulfure d'hydrogène et $LD_{2h}^{CH3CH2SH} = 100$ ppm pour l'éthanethiol.

Tab. II.8 – TMOS-DTNB

Formulation	Ratio molaire
TMOS	1
MeOH	5
DTNB	0,004
APTES	0,03
H_2O	4

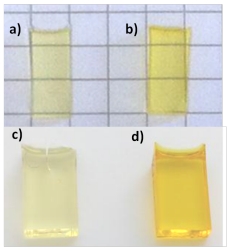


Fig. II.17 – Exposition H_2S. a), c) non exposés ; b) 2 h - 5 ppm ; d) 2h - 100 ppm.

II.3.4 Mise en place de formulations TEOS

Nous avons donc étudié la mise en place de formulations TEOS capables de détecter H_2S grâce à sa réaction avec le DTNB. L'étude porte sur l'optimisation de cette réaction au sein d'un xérogel à matrice TEOS dopé avec la molécule sonde. Ces travaux ont été menés conjointement avec Arnaud Lemelle.

Le cahier des charges de la nouvelle formulation était le suivant :

— Substitution de tous les produits CMR par d'autres moins dangereux

— Détection purement colorimétrique

— Performance au moins égale à celle des capteurs TMOS

Les xérogels sont exposés à deux composés volatils soufrés H_2S et l'éthanethiol.

La détermination de limite de détection s'effectue en pseudo-cinétique. Les deux COV sont générés de manière distincte. Les expositions à l'éthanthiol ont lieu selon le protocole d'exposition n°2 (cf. p 169) tandis que les expositions à H_2S se déroule selon le protocole particulier n°3 (cf. p 176).

Deux voies, basique et acide, ont été envisagées pour catalyser la réaction sol-gel.

Les xérogels ont été synthétisés selon le protocole n°2 (cf. p184) au format monolithique 800 µm puis séchés en étuve à 45°C. Le refroidissement du sol a été effectué *via* un bain à -20°C lors de l'étude de la catalyse NaOH et *via* un bain de glace lors des catalyses NH_4OH ou acide citrique.

Catalyse basique

Dans un premier temps, NaOH a été testé comme catalyseur de la réaction sol-gel. La tenue mécanique des xérogels est très bonne. Les xérogels présentent toutefois une couleur orangée, signe qu'au moins une partie des ponts disulfures est brisée. NaOH étant une base forte, cela est cohérent. En effet, il a été montré, en milieu liquide, qu'à pH basique, la rupture du pont disulfure est spontanée, concurrençant la rupture liée à la présence des COV cibles. [76]

Les évolutions colorimétriques et en absorbance de deux xérogels, le premier étant exposé à 500 ppm d'H_2S, et le second stocké à l'air dans un pilier rodé, sont similaires. L'aspect cinétique ne permet pas ici de différencier une rupture du pont disulfure initiée par H_2S d'une rupture spontanée.

Le NH_4OH a alors été testé comme catalyseur basique. Une concentration trop élevée en catalyseur conduit à une tenue mécanique dégradée. Cependant, une diminution du taux de catalyseurs permet l'obtention de propriétés mécaniques correctes. Si à forte concentration en ppm, les cinétiques de réactions, permettent de distinguer les ruptures induites par le CVS des ruptures spontanées. Cette attribution est beaucoup moins évidente à faible concentration. De fait, les limites de détection sont difficiles à établir. Les valeurs données dans le tableau en annexe (p.A.1) correspondent aux concentrations les plus basses (en ppm) pour lesquelles, il n'y a pas de litige, soit de 300 ppm en 1 h pour H_2S et de 400 ppm en 3 h pour l'éthanethiol. Cette voie n'est donc pas pertinente pour la détection de COV microbiens pour lesquels il est nécessaire de pouvoir détecter de très faibles concentrations.

Catalyse acide

La catalyse acide favorise la forme anionique incolore TNB^- et est donc moins favorable à une détection colorimétrique.

L'acide citrique a été testé comme catalyseur acide d'abord selon le protocole n°2 (cf. p184). Les limites de détection obtenues sont alors de 300 ppm en 1 h pour H_2S et de 500 ppm en 6 h pour l'éthanethiol. Ce qui n'est pas assez sensible pour l'application visée. De plus, ce catalyseur acidifie le milieu et n'est donc favorable à la détection colorimétrique. Il serait possible de moduler le pH équivalent *via* le ratio d'ABTES mais cela impliquerait aussi d'augmenter la cinétique de réaction. Du triéthylphosphate a été inclus à la formulation afin d'augmenter le pH équivalent. La détection colorimétrique est alors possible, les limites de détection atteintes sont alors de 50 ppm en 1 h pour H_2 et de 200 ppm en 2 h pour l'éthanethiol.

II.3.5 Résultats

Le tableau A.1, en annexe page 178, présente les formulations TEOS de xérogels ainsi que leur limite de détection. Les calculs permettant d'évaluer la quantité de COV en phase gazeuse sont disponibles en annexe (p.176).

II.3.6 Conclusions et perspectives sur la détection de CVS *via* des formulations TEOS

Les limites de détection des capteurs TEOS contenant du DTNB sont plus élevées que celles des capteurs TMOS. Bien que l'utilisation de produits CMR soit déconseillée, leur emploi apparait ici nécessaire à la synthèse de xérogels permettant des limites basses de détection. Pour la suite du projet, nous continuerons donc les synthèses au TMOS.

II.4 Conclusion et perceptives

Nous avons dans un premier temps sélectionné les sol-gels en fonction de critères applicatifs. Parmi ces critères, le caractère acido-basique de ces matériaux est particulièrement intéressant. Bien que très utile, cet outil laisse apparaitre ses limites à la nano-échelle. Notre modèle revient à considérer le matériau comme un réseau de nano-réacteurs aqueux. Or à cette échelle, la proportion d'eau liée par rapport à l'eau libre n'est plus négligeable. Il a ainsi été mis en évidence que la notion de pH n'était plus légitime.

Par la suite, les caractérisations structurales SAXS ont mis en évidence que les formulations TMOS possédaient une structure moins compacte que les TEOS. Cependant, sans précurseur fonctionnalisé, ces porosités sont peu définies et demeurent floues. Les deux matrices diffèrent également par l'impact de l'incorporation de précurseur fonctionnalisé au sein de la structure. Les variations de structure des xérogels TEOS dues à la présence d'un précurseur fonctionnalisé sont quasi inexistantes. Les modulations apportées par un haut taux d'ABTES sont à relier à l'aspect catalytique du groupement fonctionnel porté par le précurseur fonctionnalisé, (un groupement aminé). En effet, en catalysant la réaction sol-gel, l'ABTES limite le réarrangement du réseau.

En revanche, les matériaux TMOS, pour lesquels le temps de gélification est plus court, sont sensibles à la présence de précurseur fonctionnalisé sans caractère catalytique particulier. L'encombrement stérique a donc un vrai rôle dans la formation des pores. L'apport supplémentaire d'un effet catalyseur de réaction sol-gel permet de conserver l'interface des pores bien définie, en limitant le réarrangement du réseau lors de la gélification.

Par ailleurs, ces mesures expliquent le constat expérimental selon lequel les xérogels TEOS sont moins performants que les xérogels TMOS, le premier développant moins de porosité. Le COV pénètre plus difficilement dans le réseau et est donc moins accumulé. Cependant, des grades supérieurs de pureté du produit sont disponibles pour le TEOS. Cette pureté est particulièrement importante pour la détection en fluorescence.

Contrôler la cinétique de gélification est donc le moyen de contrôler la structure du xérogel et, de fait, le transfert de matière à l'intérieur du matériau.

Une expérimentation complémentaire extrêmement intéressante serait de suivre par SAXS la cinétique de gélification d'un sol-gel. Cela permettrait d'étudier le réarrangement du réseau, puis d'en déduire la vitesse de gélification la plus favorable au transfert de matière à l'intérieur du matériau.

Les chapitres suivants présentent les différentes stratégies mise en œuvre pour détecter les bactéries à partir des COV piégés au sein des xérogels, d'abord *via* une analyse globale du métabolome bactérien puis *via* la détection de COV ciblés.

Chapitre III

Analyse du profil olfactif formé par les COV endogènes des bactéries

Le panel de COV endogènes [1] émis par une bactérie forme un profil olfactif qui lui est propre (Figure I.3 au chapitre I page 22). De fait, l'analyse de ce mélange gazeux complexe est une voie intéressante pour détecter puis identifier les espèces microbiennes.

Ce chapitre présente l'étude de deux modes de transduction (Absorbance avec sonde aspécifique - p.68- et fluorescence sans sonde - p. 97-) pour l'analyse du métabolome bactérien. Ces deux modes de transduction reposent sur l'utilisation de sol-gel monolithiques. Ce format a été choisi car il est facilement préhensible et donc aisément manipulable par un opérateur.

Les xérogels sont analysés en absorbance ou en fluorescence selon le mode de transduction sélectionné. La figure III.1 résume les différentes composantes utiles à l'analyse en absorbance et en fluorescence.

Analyser l'absorbance d'un matériau et son évolution revient à travailler en transmission et donc dans la direction du faisceau incident (Figure III.1). Dans cette direction, le signal de fluorescence existe mais son intensité est trop faible par rapport à l'intensité transmise, pour être détectée. Pour étudier la fluorescence, la direction d'étude est pivotée de 90° par rapport au faisceau incident, susceptible de parasiter la mesure. Cette géométrie permet un rapport signal/bruit favorable à la détection de la fluorescence. Une partie de la lumière incidente est transmise par diffusion dans le matériau mais elle n'empêche plus la détection de fluorescence.

En absorbance nous étudierons l'évolution d'un réseau de capteurs multiparamétriques composés de xérogels dopés avec des sondes colorimétriques. Tandis qu'en fluorescence nous étudierons les motifs visibles sur les cartes d'excitation-émission (Excitation-Emission Matrix : EEM). Il s'agit d'un mode de représentation graphique 2D, obtenu par balayage en longueurs d'onde d'émission et d'excitation.

1. Un composé volatil est qualifié d'endogène lorsqu'il est émis par une bactérie dans son milieu naturel

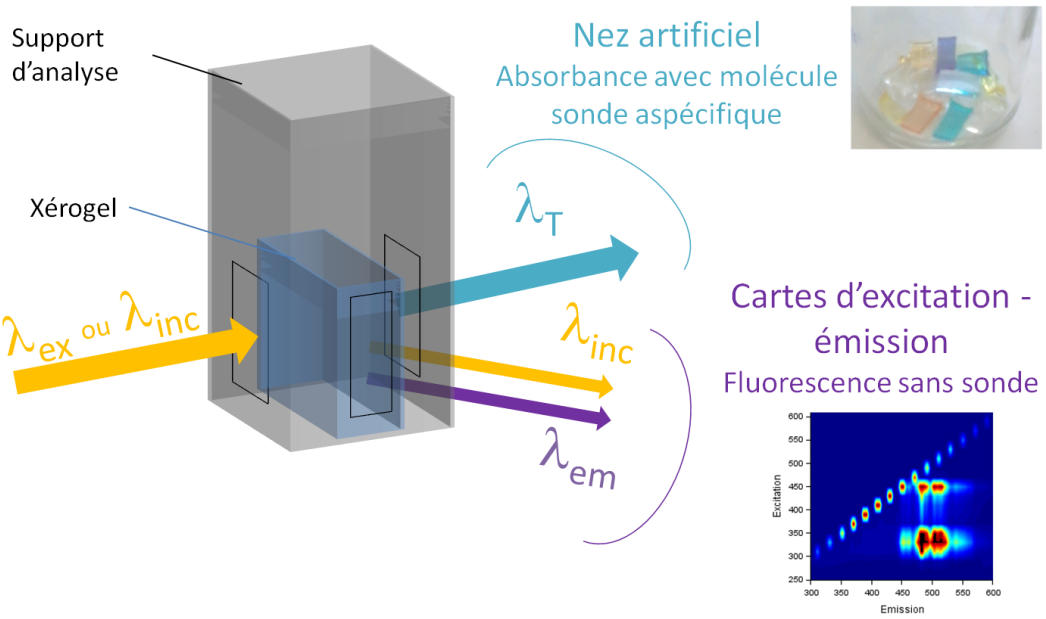


Fig. III.1 – **Modes de transduction étudiés pour l'analyse globale des profils olfactifs bactériens.**

III.1 Approche Nez électronique

III.1.1 L'idée de nez artificiel

Les nez artificiels sont des ensembles multiparamétriques regroupant des réseaux de capteurs peu ou pas spécifiques. [35] [78]. Le profil d'interaction d'un nez artificiel dépend de la réponse individuelle de chaque capteur. En effet, chaque capteur génère un profil d'interactions différent de son voisin. Les interactions classiquement mises en jeu sont des interactions d'adsorption pure donc réversibles. Les variations légères de la polarité en sont un exemple. Dans notre cas, l'eau étant le principal interférant, l'étude des variations de polarité n'était pas pertinente. En plus d'interactions d'adsorption pure, nous avons travaillé sur l'interaction acido-basique ainsi que sur divers profils de réactivité.

L'idée principale de ce chapitre est d'obtenir une spécificité de la réponse globale d'un nez artificiel colorimétrique à base de xérogels à partir de réponses aspécifiques de différentes formulations de xérogels. Par convention, au cours de ce chapitre, le terme capteur renverra à un xérogel tandis que le terme *Nez* renverra au réseau de capteurs.

Pour ce faire, différents capteurs ont été étudiés. Les capteurs se composent d'une matrice de xérogel contenant une molécule de chromophore [2]. La matrice est fonctionnalisée pour que la molécule sonde soit à t_0 dans un état particulier. Petit à petit, le chromophore va réagir avec l'atmosphère environnant le monolithe, entraînant un changement

2. Il ne s'agit pas ici de liaison covalente, les molécules chromophores ne réagissant pas chimiquement avec les alcoxysilanes. Les molécules chromophores sont piégées physiquement à l'intérieur du réseau sol-gel, lors de la gélification.

de couleur de la matrice. Les interactions mises en jeu sont, par exemple, des interactions de type acido-basiques. Ce type d'interactions n'est pas spécifique à une molécule donnée mais caractérise un aspect de la cible : donneur ou accepteur de proton. Les réponses de différents capteurs forment un motif. Ce motif, combinaison de l'ensemble des réponses du nez, a la forme d'une matrice.

Le paragraphe suivant présente l'analyse en composante principale de cette réponse complexe. La démarche consiste en une première étape d'apprentissage : il s'agit d'associer un profil réactif à une molécule donnée, puis en une étape de déconvolution qualitative ou quantitative afin d'identifier un gaz suivant les profils réactionnels précédemment appris. Cette méthode nous a permis d'analyser l'ensemble des données issues du *Nez* colorimétrique.

III.1.2 L'Analyse en composantes principales (PCA : Principal Component Analysis)

III.1.2.1 Les objectifs de la PCA

L'ensemble des données issues des spectres d'absorbance des différents capteurs du nez forment une matrice à N dimensions dont les individus constituent un nuage de points dans un espace à N dimensions. La dispersion de ce nuage, ou inertie, permet de séparer et de distinguer les différents sous-groupes au sein des résultats. [79] [80] [81]

L'analyse en composantes principales (PCA) est une méthode statistique de traitement de données permettant, d'une part, de maximiser l'inertie du nuage de points, *via* un changement de repère, favorisant ainsi la distinction des sous-ensembles, et ,d'autre part, de concentrer le maximum de l'information dans un nombre réduit d'axes principaux. Cette concentration est particulièrement importante car elle permet de conserver le maximum de l'inertie lors d'une représentation graphique en deux ou trois dimensions (Figure III.2).

Outre la maximisation de l'inertie et la possibilité d'aboutir à une représentation graphique significative, la PCA permet également d'évaluer la corrélation des variables les unes par rapport aux autres ainsi que leur contribution respective à la réponse globale.

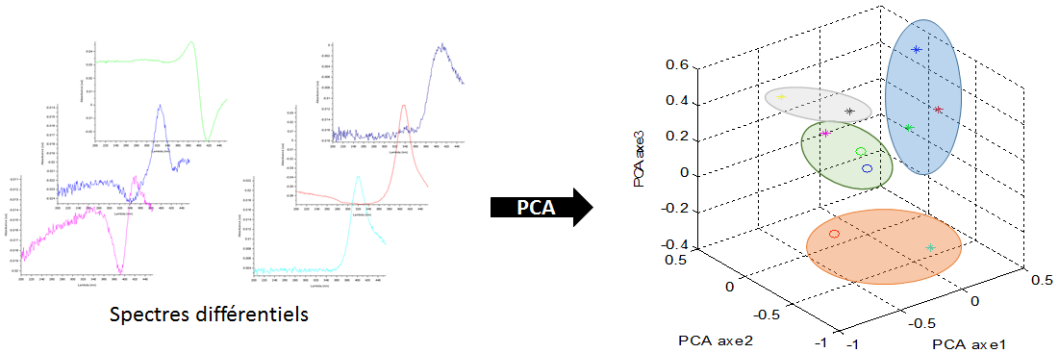


Fig. III.2 – L'application de la PCA à nos données brutes vise à représenter sous forme de graphique 2D ou 3D l'ensemble de l'information issue des spectres différentiels qui forment une matrice à N dimensions.

III.1.2.2 Mise en place de la PCA

Descripteur

La PCA consiste donc en un changement de repère afin de maximiser l'inertie du nuage de points formé par l'ensemble des résultats. Concrètement, la matrice de données issues du nez colorimétrique est formée des spectres différentiels de chaque capteur. Ces spectres différentiels sont obtenus en soustrayant les spectres d'absorbance UV-visible initiaux aux spectres finaux des capteurs.

Après normalisation, ce spectre différentiel est transformé en un vecteur, appelé descripteur, qui peut ensuite être traité par des algorithmes d'apprentissage, supervisés ou non. De nombreuses méthodes existent pour calculer un descripteur à partir d'un résultat de mesures complexes (spectre, image, etc.). L'idéal est d'employer une méthode qui permet de garder une relation bijective [3] entre l'ensemble des mesures et celui des descripteurs.

Distance euclidienne et inertie du nuage de points

L'inertie du nuage de points (Equation III.1) est la somme pondérée des carrés des distances des individus au barycentre des points formés par l'ensemble des mesures, nommé également centre de gravité.

$$I_G = \frac{1}{n}\sum(d(G.u_i)^2) \tag{III.1}$$

3. Une relation est bijective si, et seulement si, tout élément de l'ensemble d'arrivée a un unique antécédent dans l'ensemble de départ et réciproquement. Cette caractéristique permet de conserver le maximum d'informations lors du changement de repère.

Expression du moment d'inertie (I_G) du nuage en fonction des coordonnées de l'ensemble des points dans l'ensemble des dimensions.**n** : nombre de dimension de l'espace ; **d** distance euclidienne. **d(G.u$_i$)** : distance euclidienne entre **G** (centre d'inertie du nuage de points) et u$_i$ (point de l'espace à N dimension)

L'inertie du nuage de points suppose donc l'utilisation de la distance euclidienne (distance entre deux points dans un espace multidimensionnel, équation III.2)

$$d(p_i, p_j) = \sqrt{\sum_{k=1}^{n} (x_i^k - x_j^k)^2} \tag{III.2}$$

d($\mathbf{p}_i$,$\mathbf{p}_j$) : expression de la distance euclidienne entre deux points $\mathbf{p}_i$ et $\mathbf{p}_j$. **n** : nombre de dimension du repère. $\mathbf{x}_i^k$ et $\mathbf{x}_j^k$: coordonnées respectives des points $\mathbf{p}_i$ et $\mathbf{p}_j$ dans la dimension **k**

Il est nécessaire, au préalable, de s'affranchir de la notion d'unité des variables. Aussi les données sont centrées selon l'équation III.3.

$$x_i^k(centrees) = \frac{x_i^k - \overline{x^k}}{S_k} \tag{III.3}$$

$\overline{x^k}$: moyenne de la variable x^k ; S_k : écart-type de la variable x^k

Construction du nouveau repère et validation des représentations graphiques

Le nouveau repère correspond à un ensemble des nouveaux axes (axes principaux), issus de combinaisons linéaires des points dans le repère d'origine, tel que l'inertie du nuage autour de ces axes soit maximale. Pour que cette dispersion soit maximale, il faut que les nouvelles variables possèdent une variance maximale. Le changement de repère place le nouveau système de sorte que le premier axe apporte la plus grande discrimination à l'ensemble des individus, que le deuxième confère le plus de dispersion possible, non déjà prise en compte par l premier axe, et ainsi de suite. Les axes du nouveau repère ou axes principaux sont associés *via* une matrice de corrélation à des valeurs propres. Ces valeurs propres correspondent à la variance empirique des axes principaux. Leurs valeurs permettent d'identifier les axes principaux restituant la plus grande partie de la dispersion du nuage. Un histogramme des valeurs propres, comme représenté figure III.3, classe les axes principaux selon leurs valeurs propres. Les représentations en deux et trois dimensions sont des troncatures ne prenant en compte que les deux ou trois axes principaux ayant les valeurs propres les plus fortes. Plus la somme de ces valeurs propres est élevée, plus l'inertie du nuage de points en N dimensions sera conservée dans les représentations

graphiques. Ainsi, une valeur de cette somme supérieure à 80 % est appréciée. Elle témoigne que la perte d'informations engendrée par la représentation graphique ne nuit pas à l'interprétation.

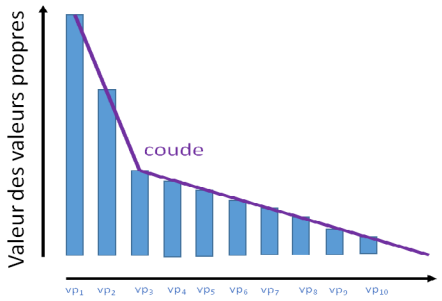


Fig. III.3 – **Histogramme des valeurs propres.** Visuellement le nombre d'axes à considérer, pour préserver le maximum d'informations, se traduit le plus souvent par la présence d'un coude. Les axes correspondant aux valeurs propres situées avant le coude doivent être conservés. Si plus de trois axes sont concernés, ou qu'aucun coude n'est visible, la représentation graphique subira une perte d'informations importante, car cette dernière est portée par plus de trois axes.

Corrélation des variables

La PCA offre aussi la possibilité d'évaluer la corrélation des variables d'origine *via* le tracé de cercles de corrélation (Figure III.4). Il s'agit d'une projection des variables sur le plan des composantes principales. Cette représentation permet de visualiser d'une part les corrélations entre les variables d'origine et les composantes principales et, d'autre part les corrélations entre variables d'origine. Ainsi, plus une variable est proche du bord du cercle des corrélations et de l'axe, mieux elle est représentée. Graphiquement, les variables corrélées se trouvent regroupées au sein du cercle de corrélation.

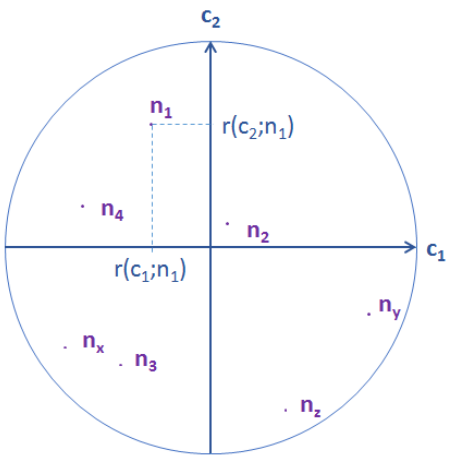


Fig. III.4 – **Représentation des variables au sein d'un cercle de corrélation.** Sur cet exemple les variables n_x et n_3 sont corrélées. $r(c_j,n_i)$: coefficient de corrélation linéaire entre c_j (composante principale) et n_i (variable d'origine).

Le traitement de données par PCA a été mis en œuvre sur les données récoltées à partir d'un Nez colorimétrique composé de xérogels contenant des sondes colorimétriques.

Les paragraphes suivant s'attachent donc à la mise en place d'un nez artificiel colorimétrique, à sa mise en œuvre puis aux traitements des résultats par analyse en composantes principales.

III.1.3 Analyse par spectroscopie d'absorbance et colorimétrie

III.1.3.1 Mise en place du *Nez* à capteurs xérogels

Sélection des différentes sondes

La sélection des molécules sondes dépend de la nature des interactions mises en jeux. Ces dernières sont à relier aux principaux COV émis par les bactéries. Ainsi, parmi les COV les plus courants ou les plus caractéristiques de pathogènes microbiologiques, différentes fonctions chimiques se distinguent. Le tableau III.1 présente une liste non-exhaustive de COV microbiens ainsi que les principales interactions chimiques auxquelles ils sont sensibles.

COV	Caractéristiques et Réactivité chimiques	Spécificité bactérienne
Mercaptans	Réducteur - Réaction ciblée	Générique
Sulfure de diméthyle	Doublet non liant	Générique
Acide isovalérique	Polarité - Acide	*S.aureus*
Amines	Doublet non liant	Générique
Indole	Réaction ciblée	*E.coli*
Toluène	Polarité	Générique

Tab. III.1 – **Exemples de COV microbiens.** Le tableau précise les interactions réactionnelles attendues ainsi que la spécificité bactérienne éventuelle du COV.

L'axe de développement consiste à synthétiser des matrices sol-gel nanoporeuses et à les doper avec une molécule sonde, sensible aux interactions (liaison-hydrogène, acide-base de Lewis, interaction métal-ligand, solvatochromie) présentées précédemment afin de cibler différents COV. Il est donc important de choisir des sondes de natures différentes afin d'étudier des interactions avec différents environnements. Étudier les profils réactifs revient à étudier chaque capteur dans plusieurs conditions de mesure. Ces différents types de sondes ont été étudiés en milieux liquides puis incorporés au sein de matrices xérogels.

Interactions solvatochromiques

Comme présenté au chapitre d'introduction (Chap.I p22), les bactéries émettent des COV de natures différentes. Certains sont apolaires aprotiques (toluène), d'autres sont polaires aprotiques (acétone), d'autres enfin sont polaires protiques (méthanol), aussi les molécules solvatochromiques sont de bons candidats comme molécules sondes à incorporer au sein de xérogels.

Le spectre d'absorption d'un composé solvatochromique dépend du solvant utilisé. Il s'agit d'une modification de l'intensité et / ou de la forme des transitions électroniques. Trois types de réponses sont ainsi observables et permettent de classer les espèces chimiques en trois groupes distincts.

— Le spectre des produits du premier groupe est peu ou pas influencé par le solvant.

— Le deuxième groupe comporte les molécules à solvatochromie positive ou bathochromisme. Dans ce cas, les bandes d'absorption des composés sont déplacées vers les grandes longueurs d'ondes lorsque la polarité du solvant augmente.

— Enfin, le troisième groupe est composé des molécules à solvatochromie négative ou hypsochromisme, qui suivent le phénomène inverse : déplacement des bandes d'absorption vers les faibles longueurs d'ondes quand la polarité augmente.

Le pigment de Reichardt (RD) et le Brillante Yellow (BY) [4] (Figure III.5) illustrent ces phénomènes.

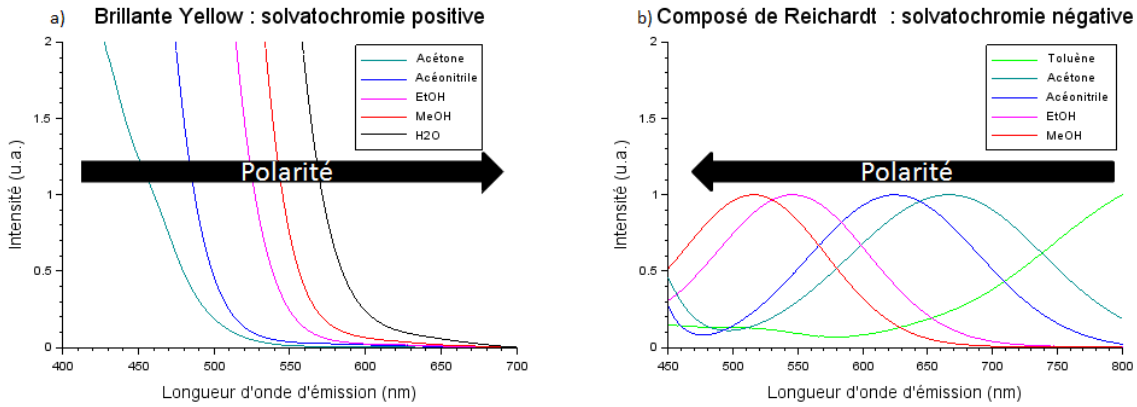


Fig. III.5 – Deux pigments solvatochromiques. Le Brillante Yellow illustre la solvatochromie positive (a), tandis que le composé de Reichardt figure la solvatochromie négative (b)

Trois molécules à caractère solvatochromique ont été sélectionnées : le vert de malachite (MG - figure III.6), le Brilliant Yellow (BY - figure III.7), le composé de Reichardt (RD - figure III.8).

4. le sel disodique 4,4'-Bis(p-hydroxyphenylazo)stilbene-2,2'-disulfonic acide ne possède pas de nom courant en français aussi pour des raisons de simplification nous utiliserons le terme anglais dans le reste du manuscrit

Afin de prévoir les résultats escomptables lors de l'exposition des monolithes contenant les sondes solvatochromiques, une étude préliminaire a été effectuée en milieu liquide.

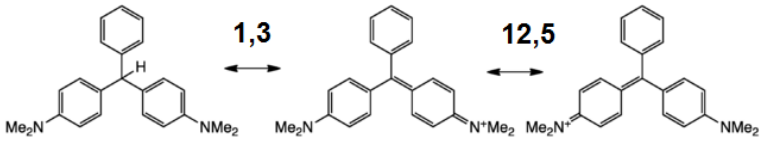


Fig. III.6 – **Vert de malachite**. La forme adoptée par le vert de malachite dépend du pH. Les valeurs précisées ici correspondent au comportement du vert de malachite en milieu liquide. Cependant au vu des zones de virages, ce phénomène ne devrait pas intervenir au sein de nos matériaux.

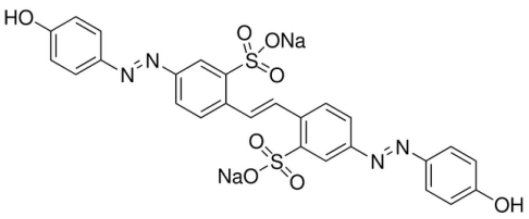


Fig. III.7 – BY

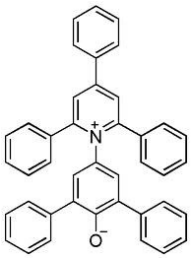


Fig. III.8 – RD

Les plus grands déplacements solvatochromiques sont obtenus avec le composé de Reichardt et le Brillante Yellow. Le vert de malachite permet néanmoins la distinction des composés polaires et apolaires.

Interactions acido-basique de Lewis

Les porphyrines possèdent une structure formant une cage moléculaire plan-carré. L'aromaticité du macrocycle induit des propriétés d'absorbance. Le cœur de cette structure peut être occupé par un atome de métal qui permet de moduler ces propriétés. Cette structure leur confère d'intéressantes propriétés d'absorbance et de réaction.

La porphyrine seule porte deux azotes possédant des doublets non liants et deux qui portent des H. En cas d'inclusion d'un métal, le doublet est alors engagé dans une liaison métal ligand. Le cation métallique se trouve donc au centre de quatre azotes. Cet acide de Lewis a la possibilité d'interagir avec les bases de Lewis présentes dans l'environnement ambiant notamment avec les oxygènes et leurs doublets non-liants.

En modulant la nature du cation métallique, et son degré d'oxydation, au cœur de la cavité de complexation, il est possible d'obtenir une gamme d'interactions étendue. En

effet, modifier les effets donneurs et accepteurs du ligand ouvre la possibilité de mettre en place une gamme de sensibilités différentes.

Ainsi, lors de ses travaux B.Johnson-White utilise la Méso-tétra (4-carboxyphényl) porphine (CTPP) comme molécule sonde incorporée dans des silices mésoporeuses. [82] Cette méthode permet une détection colorimétrique de COV tels que le toluène, le cyclohexane et l'éthanol.

Malheureusement, l'inclusion de porphyrines au sein des xérogels monolithiques s'est avérée complexe. Premièrement, il a fallu trouver un solvant pour solubiliser la molécule et l'incorporer à la formulation de manière homogène. La seconde difficulté a été l'étape de séchage. En effet, les solvants d'incorporation étant très volatils, une démixtion apparaissait lors des séchages (FigureIII.9) .

Pour pallier ce problème, l'une des solutions serait d'abandonner le format monolithique au profit de couches minces. La gélification d'une couche mince étant plus rapide, les différences d'évaporation des solvants seraient minimisées ; ce qui laisse espérer une diminution du phénomène de démixtion.

Finalement une seule formulation incorporant une porphyrine a pu être élaborée. Les tests ont été menés avec la MCoTPP [5] (figure III.10).

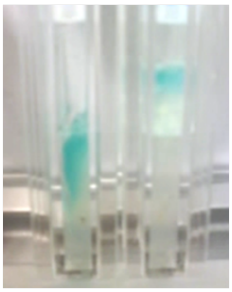


Fig. III.9 – Démixtion d'un sol-gel lors du séchage

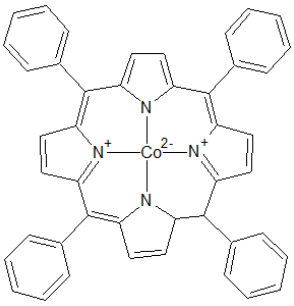


Fig. III.10 – MCoTPP

Sonde Redox

Les réactions d'oxydoréduction couramment nommées réaction redox mettent en jeu un échange d'électrons entre le réducteur (donneur) et l'oxydant (accepteur). Parmi les COV émis par les bactéries, certains, comme le couple acétaldéhyde /acide acétique (E^0=-0,58 V), sont susceptibles de subir une réduction.

Le bleu de méthylène (MB - III.11) est une sonde rédox colorimétrique, dont les formes oxydées et réduites n'ont pas les mêmes propriétés optiques. Il est à noter que le potentiel d'oxydoréduction de cette sonde dépend du pH (Equation III.11). [83] [84] [85]

5. MCoTPP : 5,10,15,20-Tetrakis(4-metho xyphenyl)-21H,23H-porphine cobalt(II)

$$E = E_0 + \frac{RT}{2F}\left(ln\left(\frac{[MB_{ox}]}{[MB_{red}]}\right) + ln\left([H^+]\right)\right) \tag{III.4}$$

Equation de Nernst de la réaction redox de MB à deux électrons et un proton.
E : potentiel appliqué ; E_0 : potentiel standard ; $[MB_{ox}]$ et $[MB_{red}]$: respectivement concentrations oxydée et réduite du bleu de méthylène.

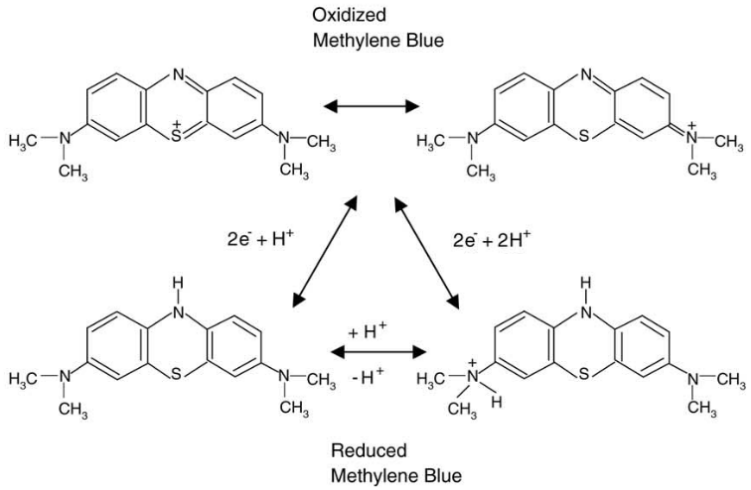


Fig. III.11 – Oxydoréduction du bleu de méthylène

Le choix s'est porté ici sur l'utilisation d'une seule sonde redox. Par la suite, il pourrait être intéressant d'explorer une gamme de potentiel d'oxydoréduction étendue afin de diversifier la réactivité des espèces. De bons candidats seraient, par exemple, d'autres composés de la famille des phénothiazines, des phénazines ou des phenoxazines. [86]

Interactions acido-basiques de Brønsted

Le caractère acido-basique d'une réaction est l'un des critères les plus simples pour caractériser une interaction. Trois molécules indicatrices de pH, le bleu de thymol (BT), le bleu de bromothymol (BBT) et bleu de bromophénol (BBP) permettent de balayer une large gamme de pH. Ce sont, par ailleurs, ces molécules sondes qui nous ont permis d'évaluer le pH de la solution intra-pore des xérogels selon la grille qualitative représentée figure III.12.(Chapitre II p. 40)

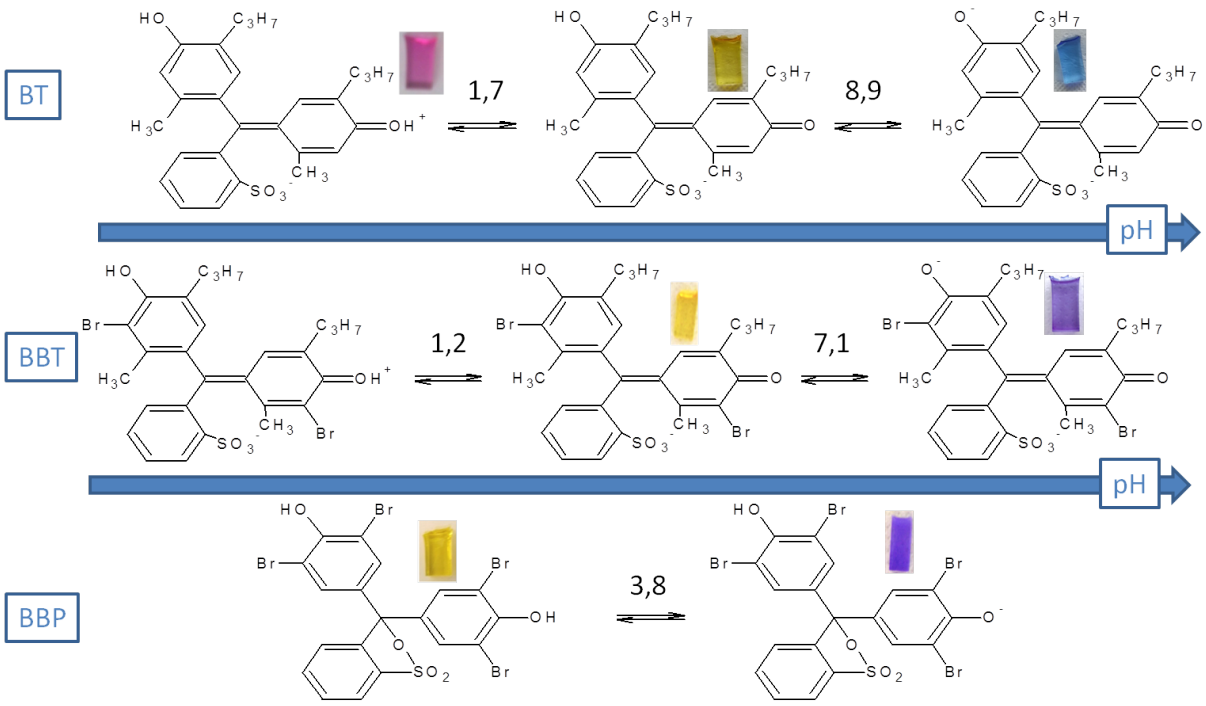


Fig. III.12 – **Couleurs des xérogels dopés avec des indicateurs acido-basiques.** Les valeurs de pH indiquées, sur cette illustration correspondent au virage colorimétrique en milieu liquide, elles sont données à titre indicatif. Nous avons vu au chapitre II que le pH équivalent était un outil pragmatique mais non rigoureux.

Sondes spécifiques

Aux réactions peu spécifiques décrites ci-dessus, il a été choisi d'ajouter des réactions ciblées. Ces réactions irréversibles visent à être les plus spécifiques possibles, contrairement aux équilibres explorés précédemment.

L'ajout de capteurs spécifiques au *Nez* colorimétrique permet de rendre ce dernier plus discriminant car ces réactions spécifiques permettent de cibler un type de composé chimique.

La molécule de DTNB (Figure III.13) permet la détection de mercaptans et de groupements thiol par rupture d'un pont disulfures.

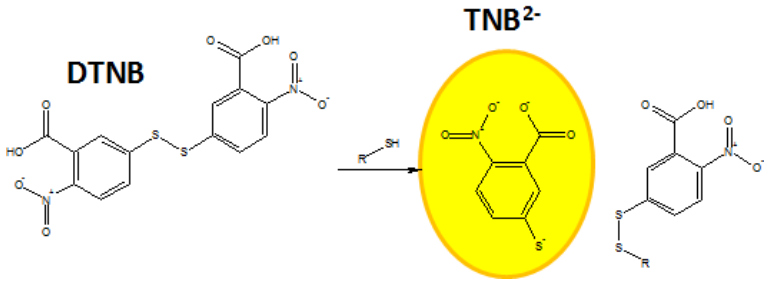


Fig. III.13 – Rupture du pont disulfure du DTNB ((5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid))) par H_2S

Le para-diméthylaminocinnamldéhyde (DMACA - Figure III.14) a été choisi car il

permet de détecter et d'identifier plusieurs COV aminés (Tableau III.2) *via* des réactions sondes-cibles [18-19]. La forme neutre du DMACA absorbe à 385 nm avec un coefficient d'extinction molaire élevé (ε_{383nm} = 35 000 L.mol^{-1}cm^{-1}), tandis que sa forme protonée absorbe à 280 nm (ε_{276nm} = 22000 L.mol^{-1}cm^{-1}). Il est donc plus favorable de se placer à un pH faible afin qu'une concentration forte en DMACA ne gêne pas la détection. La plupart des réactions demande une catalyse acide ; aussi, de l'acide chlorhydrique est ajouté à la formulation.

Les chapitres II et IV présentent des études détaillées utilisant respectivement le DTNB et le DMACA.

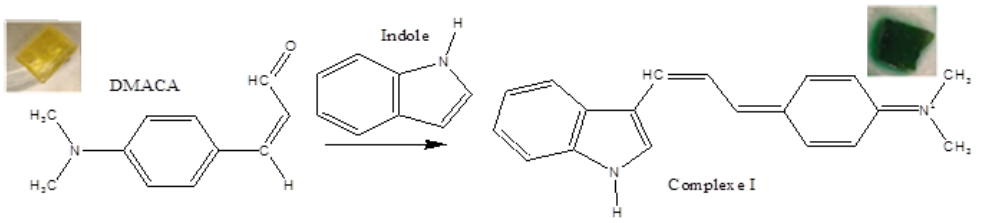


Fig. III.14 – Réaction spécifique du DMACA ((p-dimethylamino-cinnamaldehyde)) avec l'indole

	$H_{CC}^{298.15K}$ [17]	Propriétés optiques des composés formés[18-19]		
		Bande d'aborbance 1	Bande d'aborbance 2	Bande d'aborbance 3
2'-amino-acétophénone	1,4.10^{-7}	λ_{max} = 550 ε = 5 535 Π = 7,75.10^{-4}		
β-naphthylamine	3,31.10^{-6}	λ_{max} = 540 ε = 89500 Π = 1,93		
Indole	2,16.10^{-5}	λ_{max} = 550 ε = 100 000 Π = 2,16	λ_{max} = 624 ε = 103 900 Π =2,24	
Scatole	8,7^{-5}	λ_{max} = 620 ε < 18 592 Π < 1,62	λ_{max} = 664 ε < 26 881 Π < 2,34	
Tryptophane	8,1.10^{-13}	λ_{max} = 542 ε < 100 Π < 8.10^{-11}	λ_{max} = 585 ε < 100 Π < 8.10^{-11}	λ_{max} = 660 ε < 100 Π < 8.10^{-11}

Tab. III.2 – Composés aminés réagissant avec le DMACA. Π est le produit de la constante de Henry, caractérisant la capacité du composé à passer en phase gazeuse et du coefficient d'extinction molaire. Plus cette valeur est élevée, plus la détection du composé est aisée. A l'inverse, le 2'-amino-acétophénone et le tryptophane ont peu de chance d'être détectés. λ_{max} est exprimée en nm, ε en L.mol^{-1}cm^{-1} et Π en L.mol^{-1}cm^{-1}

III.1.3.2 Incorporation des molécules sondes au sein des matrices xérogels et sélection des formulations

Les monolithes sol-gel dopés par des molécules sondes sont synthétisés à partir de formulation TMOS. Les porogènes utilisés ont été l'ABTES et le n-butyl. Ces deux porogènes possédant des groupements fonctionnels différents, chaine alkyle et groupement amine, le pH intra-pore des matériaux est différent. Il est ainsi possible de synthétiser des capteurs à partir d'une même molécule sonde, en l'incorporant à une formulation mettant en jeu du n-butly ou de l'ABTES.

Lorsque cela est possible, la molécule sonde est mise en solution dans le méthanol. Les précurseurs sont hydrolysés et mélangés à la solution méthanolique (cf. protocole de synthèse p.179).

Le Tableau III.3 présente les sondes utilisées ainsi que leurs principales propriétés physico-chimiques. Les monolithes sont laissés à gélifier puis séchés durant une période allant de quelques jours à deux semaines selon les formulations. Les temps de gélification et de séchage dépendent principalement du précurseur fonctionnalisé mais l'influence de certaines molécules sondes a pu être observée. Ainsi dans le cas des formulations n-butyl, les xérogels, contenant du bleu de thymol, gélifient en 7 jours contre 8 pour les formulations contenant du bleu de bromothymol. Dans la mesure du possible, la même formulation est appliquée pour toutes les molécules sondes. Néanmoins, les propriétés chimiques des molécules chimio-sensibles ont nécessité l'optimisation des formulations. En particulier, les coefficients d'extinction molaires des molécules étant plus ou moins forts, la concentration en molécule sonde diffère d'une formulation à l'autre. Certaines molécules n'étant solubles ni dans le co-solvant ni dans l'eau, la synthèse de leur xérogel a demandé un travail plus approfondi afin de déterminer le meilleur co-solvant d'incorporation. Le tableau III.3 regroupe les formulations ayant conduit à des propriétés mécaniques et optiques acceptables, ces xérogels ont, par la suite, été testés vis-à-vis des COV.

L'ensemble formé par ces treize formulations constitue notre *Nez*.

			Ratio molaire					
Formulation	Sonde	Porogène	MeOH	TMOS	H_2O	Porogène	Sonde	Xérogel
S0	/	ABTES	5	1	4	0,03	/	
S3	BT	n-butyl	5	1	4	0,03	$5{,}6.10^{-4}$	
$S5_{acide}$	BBT	n-butyl	5	1	4	0,03	$5{,}6.10^{-4}$	
$S5\text{-bis}_{basique}$	BBT	ABTES	5	1	4	0,03	$5{,}6.10^{-4}$	
S6	DTNB	ABTES	5	1	4	0,03	$4{,}3.10^{-3}$	
S7	MB	ABTES	5	1	4	0,03	$2{,}7.10^{-6}$	
$S8_{basique}$	BBP	ABTES	5	1	4	0,03	$5{,}4.10^{-6}$	
$S10_{acide}$	BBP	n-butyl	5	1	4	0,03	$5{,}4.10^{-6}$	
S11	BY	n-butyl	5	1	4	0,03	2.10^{-6}	
S12-C	DMACA	n-butyl	5	1	4	0,03	$5{,}4.10^{-6}$	
S16-B	MG	n-butyl	5	1	4	0,03	$2{,}7.10^{-10}$	
S17-B	MCoTPP	n-butyl	5	1	4	0,03	$2{,}0.10^{-5}$	
S18	RD	n-butyl	5	1	4	0,03	1	

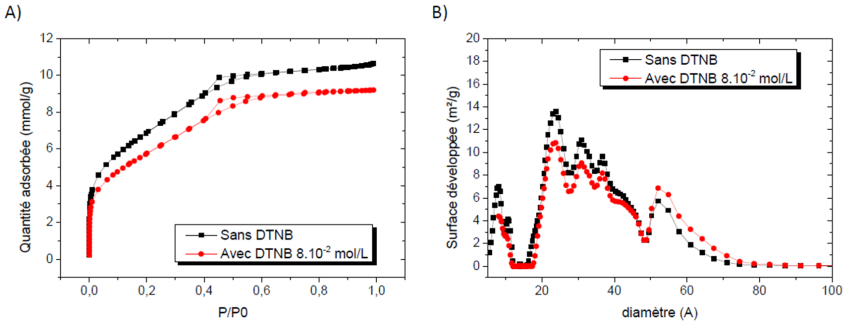
Tab. III.3 – Formulations de xérogels retenues pour former notre *Nez* test. Les photographies présentent les xérogels dopés après synthèse avant exposition.

Caractérisation structurale

Pour des raisons logistiques, il n'a pas été possible de systématiquement caractériser de manière complète chacune de ces formulations par adsorption-désorption d'azote. Les surfaces spécifiques caractérisées par la méthode de Brunauer, Emmet et Teller (BET) conduisent à des valeurs entre 420 et 530 $m^2g.^{-1}$. Seuls les xérogels contenant de la MCoTPP ont une surface spécifique plus faible ($\sim$ 150 $m^2g.^{-1}$). A titre comparatif les xérogels sans molécule sonde, synthétisés et séchés dans les mêmes conditions, possèdent des surfaces spécifiques de l'ordre de 560 $m^2g.^{-1}$. Les surfaces spécifiques obtenues offrent donc une grande surface d'interaction.

Le second paramètre important est la distribution de tailles de pores ; celle-ci s'obtient à partir des isothermes d'adsorption-désorption grâce à la théorie de la fonctionnelle de densité (DFT).

Dans le cas des dopages DTNB (formulation S6), les résultats sont similaires à ceux obtenus lors de travaux antérieurs (figure III.15).[1] Pour les autres formulations, différents temps et températures de dégazage ont donc été testés sans parvenir à des résultats cohérents.



C)

APTES	Ø	DTNB
S_{BET} ($m^2.g^{-1}$)	562	471
V_{poreux} ($cm^3.g^{-1}$)	0,37	0,32

Fig. III.15 – Caractérisation BET de xérogel TMOS/MeOH/APTES/H2O = 1/5/0,03/4 [1]. A) Comparaison d'isothermes d'adsorption-désorption de xérogels dopés ou non avec du DTNB. B) Comparaison de la distribution de tailles de pores de ces deux formulations. La distribution en taille des pores montre des matériaux micro- et méso- poreux (taille des pores allant de 8 Å à de 58 Å). Cette répartition est peu modifiée par le dopage à l'exception d'une légère augmentation de la proportion de pores de diamètre supérieur à 50 Å. C) Surfaces et volumes poreux développés au sein des deux matériaux.

III.1.3.3 Test de xérogels avec interactions aspécifiques

La phase de test des xérogels s'articule autour de la capacité des xérogels à interagir avec l'atmosphère extérieure. Les capteurs doivent être en mesure de réagir avec le milieu environnant sans avoir d'interaction chimique entre eux au sein du nez artificiel. En terme d'adsorption des gaz, les monolithes interagissent inévitablement entre eux. En effet, l'adsorption n'étant pas spécifique, il y a compétition pour l'adsorption entre les différents capteurs.

Les xérogels ont ainsi été exposés, d'une part, aux vapeurs saturantes d'analytes liquides « modèles » et, d'autre part, à des cultures microbiennes.

COV générés chimiquement

Les COV modèles sont des représentants d'une famille de composés organiques volatils microbiens susceptibles d'être émis par les bactéries. Le but de cette phase est de tester la faisabilité du projet sur des COV purs modèles, avant de pouvoir, par la suite, s'intéresser aux mélanges complexes émis par des bactéries. Dix analytes de familles chimiques différentes ont été testés lors de cette partie : composés volatils soufrés (éthanethiol et sulfure de diméthyle), acide carboxylique (acide isovalérique), ester (acétate d'éthyle), terpènes (limonène R et S), alcool (alcool isoamylique), amine (diéthylamine), amine aromatique (indole) et cétone (acétophénone).

Le tableau III.4 montre les caractéristiques des COV modèles. Les pressions de vapeur saturante étant différentes, la quantité de COV en phase gazeuse diffère selon la nature chimique de ce dernier. De fait, il est attendu que les COV, ayant les pressions de

vapeur saturante les plus hautes, soient détectés plus rapidement que ceux présentant des valeurs plus faibles.

Remarque : il est choisi de travailler en fonction de la concentration en phase liquide et non de la fraction en phase gazeuse. En effet, s'il est aisé de connaitre la concentration en milieu liquide, la fraction en phase gazeuse est évaluée *via* la constante de Henry. Or, d'une part, sa valeur est valable dans des conditions précises (elle est le plus souvent disponible à 20°C, alors que nous travaillons à 37°C) et, d'autre part, la littérature n'est pas homogène en terme de valeurs répertoriées.

Le tableau récapitulant les concentrations en phases liquides ainsi que la quantité diffusée en phase gazeuse est disponible en annexe.

COV	$\mathbf{P}_{20°C}^{vap.sat}$ (kPa)	**Réf.**
Ethanethiol	58,6	[87]
Sulfure de diméthyle	55,98	[88]
Acide isovalérique	0,06	[89]
Acétate d'éthyle	9,3 à 11,3	[90]
Limonène R&S	0,2	[91]
Alcool isoamylique	0,03	[92]
Diéthylamine	26	[93]
Indole	0,002	[94]
Acétophénone	0,04	[95]

Tab. III.4 – **Pression de vapeur saturante des COV modèles**

Les COV ci-dessus (Tableau III.4) ont été retenus pour leur valeur élevée de pression de vapeur saturante ainsi que pour leur état liquide ou solide à température ambiante. Dans un premier temps, l'exposition se fait à partir du COV pur, et non pas d'une solution de ce dernier, et ce afin de ne pas faire intervenir un autre gaz que le COV dans les expériences d'exposition.

Protocole d'exposition du *Nez* aux COV modèles

Dans le cas d'une exposition longue durée, la mise en équilibre du système par rapport au temps total d'exposition, ne peut être négligée. Les monolithes ont donc été placés dans l'enceinte dès le début. Le COV pur (solide ou liquide) est introduit dans un cristallisoir, lui-même placé dans le fond d'un dessiccateur (Figure III.16). La grille en céramique du dessiccateur est ensuite replacée. En plus des COV modèles, deux autres

conditions ont été ajoutées : un stockage à l'air pour évaluer la stabilité des capteurs et leurs possibles interactions ; une exposition à l'eau pour évaluer l'impact de l'humidité sur la mesure.

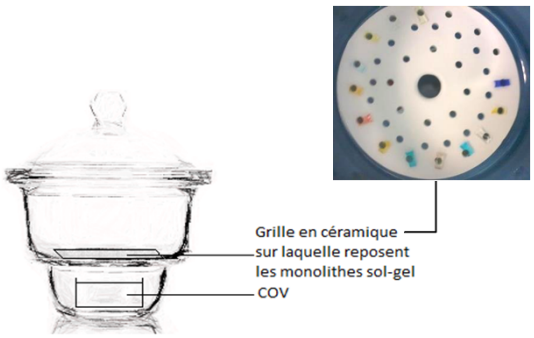


Fig. III.16 – Exposition du *Nez* à un COV pur.

Résultats colorimétriques

L'étude du *Nez*, formé par l'ensemble des capteurs xérogels, montre que, même en l'absence de COV, les xérogels pHmétriques basiques prennent une forme acide. Cette interaction intra-*Nez* est due aux interactions des autres capteurs avec l'acide chlorhydrique relargué par les capteurs DMACA. Ce type de capteur est alors retiré du *Nez*. La substitution de l'acide libre par un acide piégé dans la matrice a fait l'objet d'une étude présentée au chapitre IV.

Le tableau III.6 récapitule les changements de couleurs des xérogels au fil des expositions selon le montage présenté figure III.16. Lors de ces expérimentations le capteur dopé DMACA n'était pas inclus, il a été exposé aux différents COV individuellement (tableau III.5).

Pour le *Nez*, un nombre réduit d'interactions est constaté. Sur treize capteurs xérogels, trois (celui sans dopage ainsi que ceux dopés respectivement MCoTPP et RD) n'ont réagi avec aucun COV. Parallèlement, sur dix COV, six (Acétophénone, acétate d'éthyle, alcool isoamylique, indole et limonènes) n'ont conduit à aucune variation. Il a également été vérifié que l'air n'entraine aucune variation, afin de valider le stockage des xérogels à l'air. Le xérogel dopé bleu de thymol, initialement à l'équilibre aux alentours de son pKa le plus faible 1,7 est sujet à l'influence de l'humidité. Visuellement, il passe de rose à jaune.

Le temps de détection du xérogel BBT_{acide} par rapport au xérogel BBP_{acide} est, en revanche, plus surprenant. En effet, au vu de leur pKa respectif, la transition entre les états protoné et déprotoné devrait intervenir d'abord avec le BBP_{acide} puis sur le BBT_{acide}. Or expérimentalement, l'inverse est observé.

Le BBT porte deux cycles simplement bromés tandis que les cycles du BBP le sont doublement. Ce dernier possède donc d'avantage de groupements attracteurs. Si ce

caractère attracteur favorise l'interaction de la molécule avec la matrice sol-gel, la sonde est moins disponible pour interagir avec les COV.

Par ailleurs, le phénomène de détection surfacique est visible dans le cas du BBP_{acide} alors que, dans le cas du BBT_{acide} le cœur du monolithe a réagi. Ce phénomène indique que la diffusion des espèces à l'intérieur du xérogel BBT_{acide} est probablement plus aisée qu'au sein du xérogel BBP_{acide}.

Deux types de COV ont conduit à des variations colorimètriques : les COV influençant l'acido-basicité du milieu (acide isovalérique et diméthylamine) ainsi que les COV réagissant avec la molécule de DTNB (diméthylamine, éthanethiol et sulfure de diméthyle).

Les xérogels dopés DMACA ont réagi avec l'ensemble des COV modèles, à l'exception de l'acide isovalérique. Comme expliqué plus en détails au chapitre IV, le passage d'une couleur jaune à une couleur rouge correspond à une simple déprotonation des molécules DMACA.

Le changement jaune/vert correspond, par contre, à la réaction spécifique de formation de chlorue d'azafulvénium par réaction du DMACA avec l'indole.

Légende des tableaux III.6 et III.5

A : Acétophénone

AE : Acétate d'éthyle

AI : Acide isovalérique

IA : Alcool isoamylique

DEA : Diéthylamine

E : Ethanethiol

I : Indole

LR &**LS** : Limonènes R&S

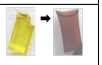
DMS : Sulfure de diméthyle

Air : Atmosphère ambiante

H_2O : Eau déminéralisée

— ☒ : Pas de variation de la couleur du xérogel

— Les xérogels de gauche correspondent à la couleur du monolithe à t_0 tandis que celui de droite correspond à celle après exposition.

COV	**A**	**AE**	**AI**	**IA**	**DEA**	**E**
S12-DMACA			☒			
COV	**I**	**LR**	**LS**	**DMS**	**Air**	**H_2O**
S12-DMACA						

Tab. III.5 – **Résultats de l'exposition individuelle du xérogel dopé DMACA et catalysé HCl aux différents COV modèles.** Les xérogels DMACA montrent une transition jaune-brun ou orange pour la majorité des COV modèles. Il s'agit d'une déprotonation des molécules DMACA avant réaction. Comme attendu, l'exposition à l'indole conduit à une couleur verte foncée qui traduit la réaction spécifique de formation du chlorure d'azafulvénium.

Formulation	**A**	**AE**	**AI**	**IA**	**DEA**	**E**	**I**	**LR**	**LS**	**DMS**	**Air**	**H_2O**
S0-TMOS	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒
S3-BT	☒	☒	☒	☒		☒	☒	☒	☒	☒	☒	
S5-BBT	☒	☒	☒	☒		☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒
S5-bis-BBT	☒	☒		☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒
S6-DTNB	☒	☒	☒	☒			☒	☒	☒		☒	☒
S7-MB	☒	☒		☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒
S8-BBP	☒	☒		☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒
S10-BBP	☒	☒	☒	☒		☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒
S11-BY	☒	☒	☒	☒		☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒
S16-MG	☒	☒		☒		☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒
S17-MCoTPP	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒
S18-RD	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☒

Tab. III.6 – **Résultats de l'exposition de notre *Nez* aux différents COV modèles. Six COV n'ont induit aucune modification colorimétrique du Nez**. Les COV, pour lesquels des interactions spécifiques ou de types acido-basiques étaient attendues, ont, par contre conduit, à des changements de couleurs.

Les résultats issus de l'étude des COV modèles n'ont pas conduit aux résultats escomp-

tés. Néanmoins, avant de clore la détection *via* un Nez réactif, deux expérimentations ont été réalisées en milieux microbiologiques.

Cultures bactériennes

Croissance et comptage bactérien

Le cycle de vie des bactéries en milieu liquide comprend quatre phases. Lors de la phase de latence, les bactéries s'adaptent à leur milieu. Si elles ne sont pas stressées par leur environnement, s'ensuit la phase exponentielle. Le taux de croissance est alors optimal et se traduit par un doublement de la population à intervalle régulier. Vient ensuite une phase stationnaire où le nombre de bactéries qui meurent et qui naissent s'équilibre : la croissance est donc nulle. Enfin survient une phase de déclin : les ressources contenues dans le milieu étant épuisées, le taux de mortalité des bactéries dépasse celui de reproduction. Pour que les résultats obtenus aient un sens, il est important de vérifier que le milieu de culture contient bien des bactéries et d'en évaluer le nombre. Le comptage s'effectue sur un support gélosé contenant des nutriments. Une nappe de bactéries est créée à la surface de la gélose. La technique dite Unité Formant Colonie (UFC) [6] est ensuite appliquée pour dénombrer les bactéries présentes à l'origine.

Milieux simples

La croissance de deux espèces microbiologiques *Escherichia coli* (*EC28*) et *Citrobacter freundii* (*CF7*) a été étudiée sur gélose COS. Ce milieu simple permet de s'affranchir de métabolites présents dans des milieux plus complexes. *Escherichia coli* est un modèle très connu dont le comportement a été très étudié. [96] [97] [98] De plus, elle émet de fortes quantités d'indole en présence d'une peptone. Certaines espèces de cette bactérie intestinale peuvent s'avérer pathogènes et responsables de gastro-entérite, d'infections urinaires ou encore de méningites. Selon la réglementation en vigueur, il est nécessaire de détecter sa présence, d'être en capacité de la dénombrer ou encore de différentier les toxinogènes des non pathogènes. *Citrobacter freundii* est un bacille responsable d'infections urinaires, d'infections de plaies ou encore de septicémies. Il est fréquemment isolé en milieu hospitalier. Cette *Enterobacteriaceae* est proche de *Escherichia coli* au niveau de leur taxonomie, toutefois leurs caractéristiques biochimiques sont très différentes.

Les deux souches testées sur gélose vis-à-vis du Nez sont *EC28* et *CF7*. Une gamme de dilution est réalisée selon le protocole microbiologie décrit p.183, puis 100 µL de la

6. La littérature emploie généralement l'abréviation anglaise cfu (colony-forming unit)

solution bactérienne estimée à 10^4 ufc.mL^{-1} sont ensemencés sur une gélose COS [7]. Les xérogels sont posés dans le couvercle de la boite de Petri (Figure III.17). Cette dernière est ensuite placée à l'incubateur (37° C) pendant 16 h. Quatre boites sont réalisées pour chacune des trois populations (*EC28*, *CF* et Témoin).

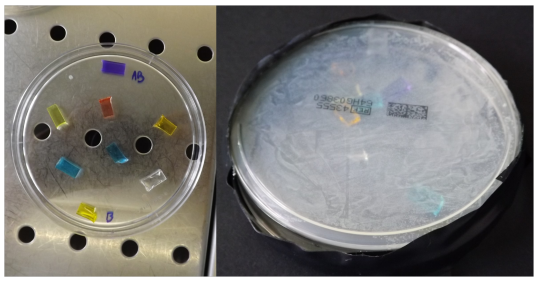


Fig. III.17 – **Exposition du Nez à des cultures bactériennes sur géloses**

En parallèle, deux boites de chaque souche sont également incubées à titre de comparaison, pour vérifier que la présence de xérogels n'impacte pas la croissance bactérienne. En effet, certaines molécules sondes comme le bleu de thymol sont des antibactériens notoires.

Enfin deux types de comptages sont réalisés :

— t_{16h} avec xérogels pour estimer la charge réelle,

— t_{16h} sans xérogels pour évaluer l'impact des xérogels sur la croissance bactérienne.

Ces comptages valident les concentrations d'inoculation et montrent que la présence de xérogels n'influence pas la croissance bactérienne.

Résultats colorimétriques

Après exposition, les Nez exposés aux deux souches de bactéries présentent des résultats similaires (exemple d'un Nez exposé à *E.coli* figure III.18). Deux changements de coloration sont visibles à l'œil. Le capteur bleu de bromophénol, initialement sous forme acide (BBP-B), est passé du jaune au bleu, tandis que le capteur dopé bleu de thymol (TB) est passé du rose-orangée au jaune. Ces deux indicateurs montrent l'adsorption d'espèces basiques telles que l'indole (pKa=16,2) ou d'amine. Parmi les xérogels DTNB, l'un de ceux exposés à *E.coli* a pris une couleur orangée, les autres sont demeurés jaunes. Ce changement de couleur témoigne de la rupture du pont disulfure de la molécule sonde. L. D. J. Bos *at al* ont montré que *E.coli* émet de faible quantité de H_2S. Cependant, il est également possible qu'un autre mercaptan ai été détecté. [38]

Il est à noter que si les résultats sont similaires pour les Nez exposés à l'une ou l'autre des deux souches bactériennes, il n'en va pas de même pour les Nez exposés aux géloses non ensemencées. Dans ce cas seul, les xérogels dopés bleu de thymol ont évolué passant

7. En microbiologie, l'unité McFarland est utilisée comme référence pour ajuster la turbidité des suspensions bactériennes de sorte que le nombre de bactéries soit dans une gamme donnée pour normaliser les tests microbiens.

du rose-orangé au jaune. La forme stable des xérogels dopés bleu de thymol, exposés uniquement à l'humidité des milieux, correspond donc à la forme moléculaire.

Des spectres d'absorbance ont également été réalisés pour permettre un traitement par PCA (cf. p94).

La photographie du capteur bleu de bromophénol initialement acide montre visiblement qu'à 16 h la surface externe du capteur a réagi (reflets bleutés en surface) mais pas le cœur du monolithe, qui demeure jaune. Après exposition, chaque xérogel est isolé dans un pilulier individuel serti. Pendant une semaine, la couleur du capteur $BBP_{basique}$ continue d'homogénéiser. Ce changement de couleur témoigne d'un nouvel équilibre entre les molécules BBP protonées et déprotonées. Les espèces responsables de la variation de pH diffusent progressivement à travers le monolithe lors d'un double processus d'adsorption-déprotonation puis de reprotonation-désorption. Les molécules sous forme moléculaire diffusent en phase au sein des pores ou à l'extérieur du matériau avant d'être de nouveau captées et déprotonées à l'intérieur du pilulier.

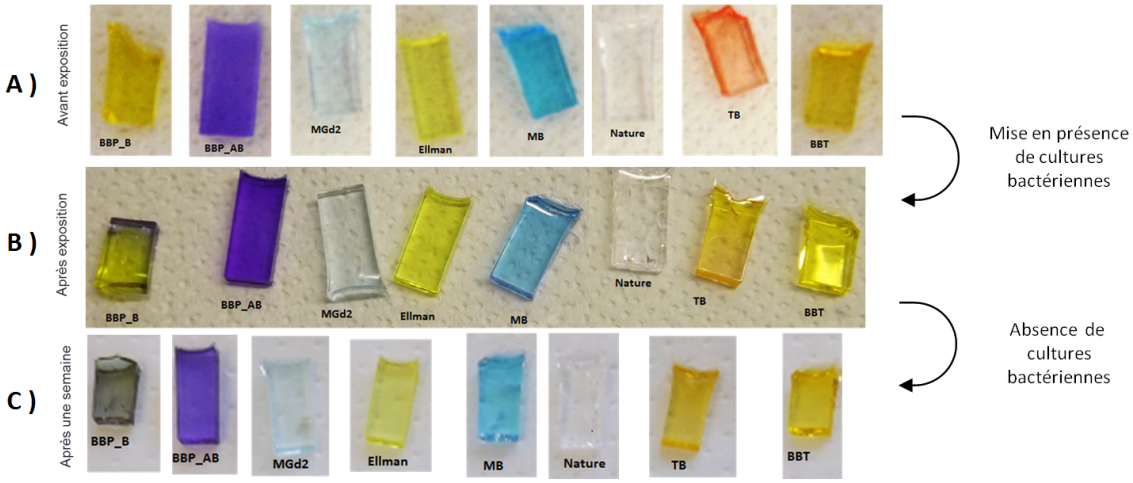


Fig. III.18 – *Nez* **exposé à une culture de *E.coli*.** A) Xérogels avant exposition. B) Xérogels après exposition. C) Xérogels après une semaine de stockage à l'air dans un pilulier fermé hermétiquement. Les COV piégés au sein des xérogels ont été laissés à diffuser en l'absence de COV supplémentaires

Il a donc été possible, colorimétriquement, de différentier les échantillons bactéries des témoins, en exposant le Nez colorimétrique à des cultures sur milieux simples. Nous avons par la suite, complété la démarche par une expérimentation similaire dans un milieu complexe.

Milieu complexe : Hémoculture

Il s'agit de mimer une hémoculture, une analyse fréquente en microbiologie clinique, qui consiste à déceler la présence de bactéries ou champignons dans un échantillon de sang. [99] L'hémoculture est un test de détection simple ; si elle est positive, des tests

complémentaires sont menées pour identifier le pathogène. Il existe donc un réel intérêt à développer des méthodes d'identification directement pendant l'hémoculture. L'une des technologies développées pour répondre à cette problématique est le flacon d'hémoculture instrumenté Specific Technologies. [100]

Les bactériémies[8] se déclarent à des concentrations de pathogènes très faibles (< 10 ufc.mL^{-1}). Aussi, la première étape de l'hémoculture consiste en une étape d'enrichissement. [101] Pour s'affranchir de cette étape, l'inoculation sera volontairement élevée.

Les expositions ont été effectuées pour trois espèces biologiques et un milieu témoin : *Escherichia coli*, qui représente 21,5% des bactériémies, de l'enterobacterie *Citrobacter freundii* et *Acinetobacter baumannii* . Cette dernière bactérie est une bactérie dite "opportuniste", elle est peu dangereuse pour des sujets sains mais entraine de graves complications chez les personnes immunodéprimées.

L'inoculum est préparé selon le protocole décrit page 183, dans du sérum physiologique. La charge bactérienne est fixée à 10^3ufc.mL^{-1} dans le milieu ; celui-ci se compose de sang défibriné et de milieu nutritif pour hémoculture suivant un ratio volumique de 1 pour 4. [101]

Les xérogels ont été placés dans un support au-dessus de l'hémoculture, comme l'illustre la figure III.19.

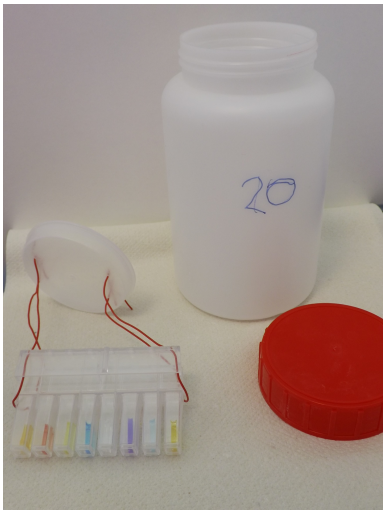


Fig. III.19 – **Support permettant l'exposition du Nez à une culture en milieu liquide.** Le montage se compose d'un flacon en PVC comportant un bouchon interne et un bouchon externe pour maximiser l'étanchéité. Un support dédié à l'accueil des monolithes est fixé au bouchon interne *via* deux fils en PVC. La forme du support permet d'isoler chaque monolithe, limitant ainsi les interactions entre eux et les protégeant d'éventuels gouttes de sang lors de l'agitation.

Le flacon est ensuite fermé par ses deux couvercles puis placé sous agitation dans une étuve à 37°C pendant 16 h. Ce temps est un bon compromis entre le temps de croissance des bactéries et le temps efficace visé pour cette application. Au bout de 16 h, la phase

8. Présence de bactéries pathogènes dans le sang

exponentielle est atteinte depuis 1 à 2 h, la quantité de COV produite est donc relativement faible.

Cinq flacons sont réalisés pour chacune des quatre bactéries et du témoin (milieu nutritif et sang défibriné).

— Nez 1 à 5 :*Escherichia coli* (*EC28*)
— Nez 6 à 10 : *Citrobacter freundii* (*CF7*)
— Nez 11 à 15 : *Acinetobacter baumannii* (*AB51*)
— Nez 16 à 20 : Témoins

Les comptages sont réalisés sur boites COS à partir des solutions d'ensemencement. Ils valident une charge bactérienne de 10^3 ufc.mL^{-1} dans le sang à t_0.

Résultats colorimétriques

Les résultats visuels sont regroupés dans le tableau III.7. Tous les Nez n'ont pas pu être analysés certains supports n'ayant pas résisté à l'agitation.

Un certain nombre de xérogels, toutes natures chimiques confondues, sont marqués de zones de couleur rouge. Cette couleur évoque naturellement celle du sang. Il apparait, cependant, qu'il n'y a pas pu avoir de contact physique ou de projection de la phase liquide sur les xérogels.

La plupart des Nez présente les mêmes caractéristiques post-exposition quelle que soit la bactérie. Cependant, les seuls xérogels DTNB ayant réagi, sont ceux en présence de *E.coli*. Globalement, les xérogels avec sonde colorimétrique de pH se sont déprotonés et ont vu leur pH équivalant augmenter.

	Nez	S0 TMOS	S3 TB	S5 BBT_{acide}	S6 DTNB	S7 MB	S8 $BBP_{basique}$	S10 BBP_{acide}	S16-B MG
EC28	n° 1	Coloration rouge	Jaune avec des zones rouges sombres	Présence de taches bleues ou rouges	Orangé	☒	☒	Éclats bleutés	☒
	n° 2					☒	☒		☒
	n° 3					☒	☒		☒
	n° 4					☒	☒		☒
CF7	n° 6	Coloration rouge	Jaune avec des zones rouges sombres	Présence de taches bleues ou rouges	☒	☒	☒	Éclats bleutés	☒
	n° 7				☒	☒	☒		☒
	n° 8				☒	☒	☒		☒
	n° 9				☒	☒	☒		☒
	n° 10				☒	☒	☒		☒
AB51	n° 11	Coloration rouge	Jaune avec des zones rouges sombres	Éclats bleutés	☒	☒	☒	Éclats bleutés	☒
	n° 13				☒	☒	☒		☒
	n° 14				☒	☒	☒		☒
	n° 15				☒	☒	☒		☒
Témoins	n° 16	Coloration rouge	Jaune avec des zones rouges sombres	Coloration rouge	☒	☒	Coloration rouge	☒	☒
	n° 17				☒	☒	☒	Coloration rouge	☒
	n° 18			☒	☒	☒	☒	☒	☒
	n° 19			☒	☒	☒	☒	Éclats bleutés	☒

Tab. III.7 – **Récapitulatif des changements de couleurs du Nez vis-à-vis des COV bactériens.**

☒ : Pas de variation de la couleur du xérogel

III.1.3.4 Analyse en composantes principales

La PCA s'effectue sur une matrice de données issues des résultats. La première étape consiste donc à construire la matrice à partir des spectres d'absorbance avant et après exposition. La démarche décrite ci-dessous est illustrée figure III.20 Afin de réduire le

nombre de données à traiter et de ne conserver que les significatives, les spectres d'absorbance sont réduits aux longueurs d'ondes correspondant aux différentes formes prises par les molécules sondes. A partir des spectres d'absorbance réalisés avant et après exposition du *Nez*. Les vecteurs différentiels ou spectres différentiels ($SD_{COV\,capteur}$) sont obtenus par soustraction des spectres initiaux aux spectres finaux. Pour chaque COV, les spectres différentiels sont regroupés en un unique vecteur par COV.

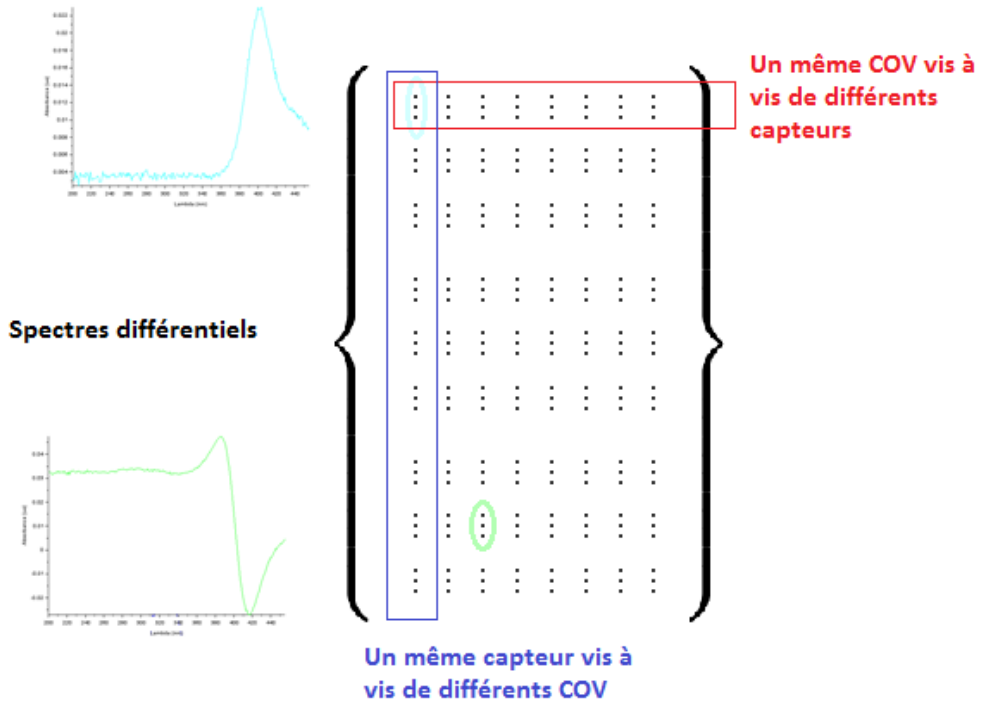


Fig. III.20 – **Matrice de données regroupant les résultats des expositions**. Chaque colonne regroupe l'ensemble des vecteurs colonnes formés des données des spectres différentiels d'un même type de capteur vis à vis de l'ensemble des COV. Chaque ligne regroupe l'ensemble des vecteurs colonnes formés des données des spectres différentiels de l'ensemble des capteurs pour un même COV

III.1.3.5 Résultats et discussions

L'analyse en composantes principales a pu être effectuée *via* l'utilisation deux logiciels Tanagra et Scilab. Le premier se caractérise par une approche manuelle, au cours de laquelle l'utilisateur est amené à choisir les paramètres les plus pertinents et à être moteur de cette analyse. Le logiciel Scilab, à l'inverse, ne permet pas d'interagir sur l'analyse, les paramètres étant pour la plupart pré-réglés. Après comparaison des deux méthodes, c'est finalement l'approche sous Tanagra qui a été retenue, malgré des résultats très similaires.

Les résultats des trois expérimentations présentées précédemment (Exposition du Nez à COV des modèles, des cultures bactériennes sur géloses, et des cultures bactériennes dans du sang) ont été traités par PCA à partir de matrices construites selon la méthode décrite ci-dessus.

Le but est d'obtenir par PCA plus d'information que par simple lecture colorimétrique.

III.1.3.5.1 Exposition du *Nez* à des COV modèles : analyse par PCA

La figure III.21 présente les résultats obtenus après exposition du Nez colorimétrique aux COV modèles. Si les deux enantiomères, limonènes R et S, sont regroupés, la répartition des autres COV n'est pas aisée à interpréter. La comparaison du dendrogramme avec le tableau colorimétrique III.6 montre que contrairement à ce qui était attendu, les six COV qui visuellement ont laissé le Nez inerte ne sont pas regroupés, les COV réactifs étant disséminés de part et d'autre.

Cette complexité d'interprétation est due au fait que, comme le montre l'analyse des valeurs propres, les axes principaux 1, 2 et 3 sont respectivement représentatifs à 33%, 24% et 15%. De fait la projection sur un plan 3D (Figure III.21-b) entraine une perte importante de l'information.

Le Nez colorimétrique et la PCA ne permettent pas de regrouper les COV selon leur nature chimique ou leur profil réactionnel.

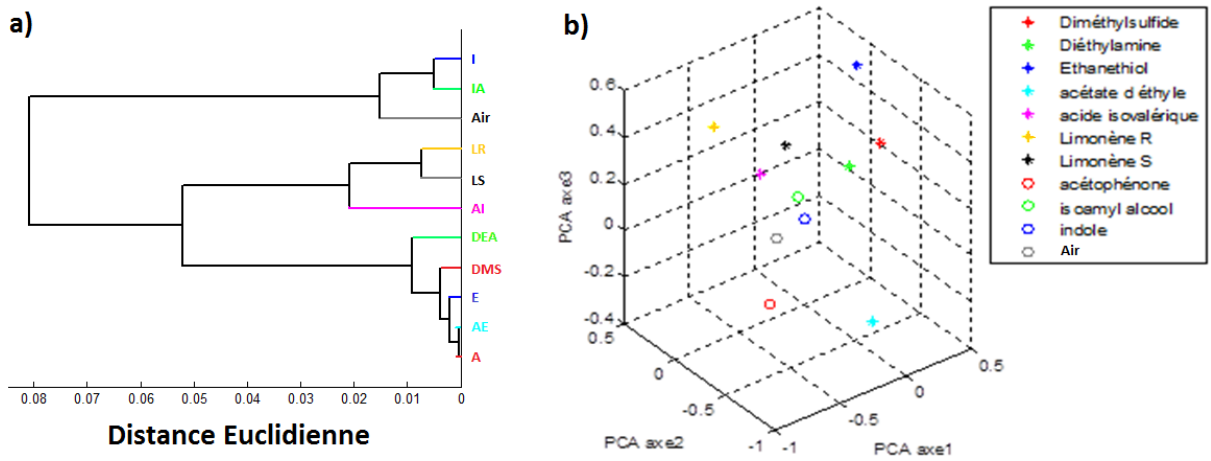


Fig. III.21 – **Visualisation de la PCA obtenues après exposition du Nez colorimétrique aux COV modèles**. Acétophénone : **A** ; Acétate d'éthyle : **AE** ; Acide isovalérique : **AI** ; Alcool isoamylique : **IA** ; Diéthylamine : **DEA** ; Ethanethiol : **E** ; Indole : **I** ; Limonène R&S : **LR** &**LS** ; Sulfure de diméthyle : **DMS** ; atmosphère ambiante : **Air**. a) Dendrogramme ; b) Projection dans espace 3D. Les deux limonènes sont regroupés, ce qui est cohérent, cependant il est surprenant que d'autres composés soient plus proches que deux énantiomères. Globalement le Nez colorimétrique et la PCA ne permettent pas de distinction les composés selon leur nature chimique

Exposition du Nez à des bactéries en culture sur gélose : analyse par PCA

La PCA a ici été appliquée aux résultats de l'exposition du Nez aux cultures bactériennes sur gélose (p. 87). La figure III.22 montre la séparation des bactéries par rapport aux témoins, sans qu'il soit possible de conclure d'avantage. L'analyse des valeurs propres révèle que les axes principaux 1,2 et 3 sont respectivement représentatifs à 35%, 29% et

16%. Le calcul des contributions des variables aux trois premiers axes principaux révèlent que la discrimination entre bactéries et témoins s'effectue donc sur des interactions de types acido-basiques (au sens de Brønsted).

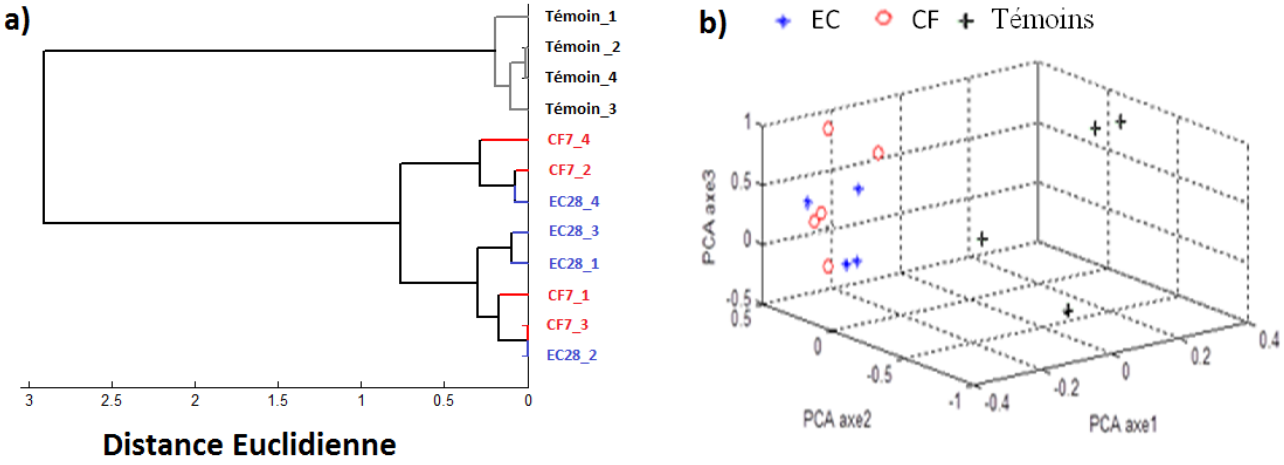


Fig. III.22 – **Visualisation des résultats de la PCA sur les données issus de l'exposition du Nez colorimétrique à des cultures bactériennes gélose TSA.** a) Dendrogramme ; b) Projection dans espace 3D. Les trois populations ***EC28***, ***CF7*** et les témoins forment deux sous-groupes distincts : les bactéries et les témoins. En culture sur gélose TSA, le Nez colorimétrique et la PCA permettent la détection bactérienne, mais pas l'identification des espèces.

Exposition du Nez à des bactéries en culture dans du sang : analyse par PCA

La PCA a, enfin, été appliquée aux résultats des expositions du nez colorimétrique à des cultures bactériennes en croissance dans du sang défibriné. Le dengrogramme et la représentation 3D (figure III.23) ne montrent pas de discrimination entre bactéries et témoins.

Contrairement aux cas des cultures sur gélose, les analyses issues des hémocultures n'ont pas permis de distinction entre bactéries et témoins. Le sang étant un fluide très complexe, de nombreux éléments sont susceptibles d'être passés en phase gazeuse. La séparation des échantillons bactériens, des témoins est donc à relier à la cinétique des éléments issus du sang en phase gazeuse. Cependant cette voie se révélant peu prometteuse, il a été choisi de ne pas poursuivre les investigations.

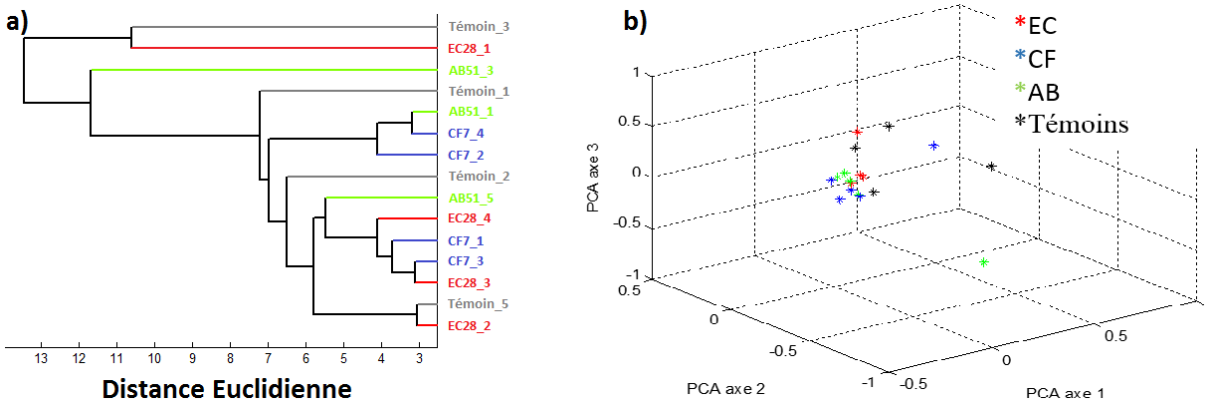


Fig. III.23 – **Visualisation des résultats de la PCA sur les données issus de l'exposition du Nez colorimétrique à des cultures bactériennes dans du sang.** a) Dendrogramme ; b) Projection dans espace 3D. Les quatre populations *EC28*,*CF7*,*AB51* ainsi que les témoins ne forment pas de sous-groupe distinct. Dans un milieu complexe comme le sang, le Nez colorimétrique et la PCA ne permettent pas la détection bactérienne.

Conclusion sur l'usage de la PCA *via* une analyse en absorbance multi-capteurs peu spécifiques

Le Nez multi-capteurs peu spécifique a permis la distinction entre bactéries et témoins sur un milieu de culture simple. Par la suite, la complexification du milieu a été un frein majeur. Il a été mis en évidence que la distinction bactéries/témoins en milieu simple, était effectuée par les xérogels dopés de sondes acido-basiques. Les autres capteurs n'ont pas montré de variations.

Le Nez colorimétrique mis en place lors de cette étude est un réseau de xérogels dopés avec des molécules sondes chimiosensibles. Il avait été choisi d'explorer différents types d'interactions sur des gammes réduites. Cette approche implique que les différents dopages et leur mise en œuvre aient des comportements similaires. Or comme le montre l'exemple des porphyrines, l'inclusion des sondes était loin d'être homogène selon les molécules.

Si les sondes acido-basiques ont montré leur capacité à réagir au sein d'un sol-gel monolithique, dans la plupart des autres cas, ce format n'a pas permis la détection. Les couches minces sont une voie possible pour la poursuite de ce mode de transduction. En effet, leur épaisseur étant réduite, une homogénéisation plus rapide du matériau est attendue, de fait un meilleur contraste signal/bruit, entre les molécules à l'état initial et les molécules ayant réagi pourra probablement être obtenu.

Par ailleurs, l'approche était ici de se concentrer sur les interactions COV cibles / molécules sondes. Cependant, il s'avère nécessaire d'étudier beaucoup plus finement le comportement des molécules sondes au sein de la matrice xérogel afin de comprendre les interactions entre les molécules chimio-sensibles dans un environnement de nanopores où l'eau liée n'est plus négligeable.

L'approche globale *via* une analyse en absorbance du profil olfactif s'est avérée complexe et difficile à mettre en œuvre dans le cadre de xérogels monolithiques.

Au vu des difficultés à élaborer un Nez artificiel colorimétrique, nous nous sommes intéressées à un tout autre mode de transduction optique toujours dans le but d'analyser globalement le profil olfactif microbien.

La seconde approche globale étudiée repose sur la spectrométrie de fluorescence *via* un double balayage en excitation et émission de longueurs d'onde (Excitation-Emission Matrix). Le matériau nécessaire à ce type de transduction optique est un xérogel sans sonde permettant la capture et la concentration des COV.

III.2 Analyse matricielle par spectroscopie de fluorescence

Les matrices d'excitation-émission (Excitation-Emission Matrix : EEM) sont un mode de représentation 2D, obtenu par balayage en longueurs d'onde de l'émission et de l'excitation. Elles ont par exemple été utilisées pour la détection de polluants. [102]

Les espèces chimiques sont caractérisées par un couple de longueur d'onde de d'émission maximum (λ_{em}^{max}) - excitation (λ_{ex}). L'idée est ici de repérer sur les cartes EEM, les points correspondants aux différents COV afin de décrire le profil olfactif d'une bactérie. La sensibilité des mesures de fluorescence permet d'entrevoir des limites de détection plus faibles qu'en absorbance.

III.2.1 Analyse des matériaux de référence pour le spectromètre de fluorescence

La figure III.24 présente les matrices d'excitation-émission réalisées pour les matériaux de référence. Ces matériaux de référence conçus pour calibrer l'appareillage, contiennent des composés fluorescents ou non, noyés dans une matrice de polymère.

L'idée est ici de vérifier que ces différents composés conduisent à des EEM distinctes. Les matériaux fluorescents présentent, sur les EEM, des motifs de fluorescence qui leurs sont propres tandis que les matériaux non fluorescents aux longueurs d'onde de travail ne présentent qu'une diagonale de lumière correspondant à λ_{em}=λ_{ex}, due à la diffusion de la lumière excitatrice. Par ailleurs des harmoniques, principalement λ_{em}=2.λ_{ex} peuvent également être observées.

L'analyse EEM et le traitement par PCA montrent la possibilité de distinguer plusieurs entités chimiques fluorescentes noyées au sein d'une matrice solide. Nous nous sommes donc tout d'abord concentré sur l'élaboration d'un matériau intrinsèquement non fluorescent, avant de tester notre méthode sur deux COV modèles.

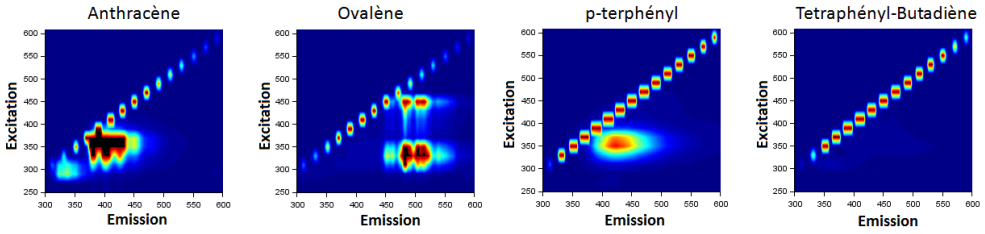


Fig. III.24 – Matrices de fluorescence obtenues par balayage en longueurs d'onde d'émission (300-600 nm) et d'excitation (300-600 nm) de matériaux de référence. Les quatre composés conduisent à des motifs distincts sur les EEM. La droite λ_{em}=λ_{ex} visible sur chacune des représentations correspond à la diffusion de la lumière d'excitation

III.2.2 Mise en place de formulations pour la détection par spectrométrie de fluorescence

III.2.2.1 Formulations TMOS

Alors que les matériaux de référence utilisés pour calibrer le spectromètre présentent une fluorescence dès leur conception, l'idée est ici d'analyser les COV fluorescents, émis par les bactéries, lors de leur capture par les xérogels. Outre de bonnes propriétés mécaniques, la principale contrainte du cahier des charges est donc l'obtention d'oxyde poreux non fluorescents.

La figure III.25 présente une série de cartes EEM obtenues pour des xérogels TMOS/ABTES$_{1/0,03}$. Alors que ce lot est homogène en terme d'absorbance et de surface spécifique, il est évident que la fluorescence est très hétérogène à l'intérieur d'un même lot. Pour celui-ci en particulier, seuls 10% des xérogels sont exploitables en fluorescence. Le contrôle de formulations TMOS et TMOS/Nbutyl$_{1/0,03}$ et TMOS-ABTES$_{1/0,12}$ montre que la nature et la quantité du porogène incorporé n'impactent pas la fluorescence intrinsèque.

Il est à noter que ces EEM sont caractérisées sur des xérogels humides (une nuit d'exposition à de la vapeur d'eau). En effet, secs, ils ne présentent pas de fluorescence particulière. La transition non radiative apparait moins efficace en liquide qu'en milieu sec. Ce phénomène est particulièrement surprenant étant donné que l'eau est décrite dans la littérature comme un "quencher" (puissant inhibiteur) de fluorescence. [103] [104] [105]

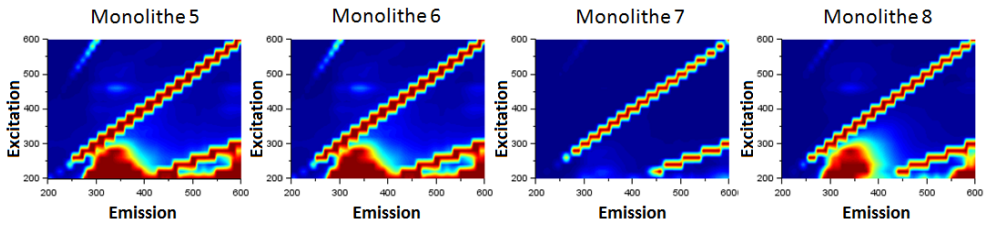


Fig. III.25 – Matrices de fluorescence d'émission-excitation (300-600 nm) de xérogels issus d'un même lot TMOS/ABTES$_{1/0,03}$ après une exposition d'une nuit à de l'eau. Sec, l'ensemble des xérogels possède une EEM semblable à celle du monolithe 7 humide.

Définition des taux de pertes

Afin d'évaluer la qualité de la production des lots de xérogels deux taux de pertes sont créés.

Le premier est le taux de perte mécanique, $\%^{P}_{Meca}$. Il s'agit du taux de xérogels sur l'ensemble d'un lot ne présentant pas la tenue mécanique nécessaire à leur utilisation en absorbance.

Le second est le taux de perte en fluorescence, $\%^{P}_{Fluo}$. Il est défini de manière similaire en excluant les xérogels intrinsèquement fluorescents des lots. Le plus souvent les lots, réformés en fluorescence, demeurent utilisables en absorbance.

Les produits de la formulation n'étant pas de nature fluorescente ou aptes à réagir pour donner des entités fluorescentes, leur fluorescence intrinsèque est liée à la présence de polluants. Sigma Aldrich mentionne, entre autres, des traces possibles de sulfate de quinine dans le TMOS. Or ce produit est extrêmement fluorescent. Sa forme dihydratée possède un rendement quantique de 0,54 (à 20°C dans 0,5 mol.L^{-1} de H_2SO_4). [106]

Il apparait donc nécessaire de travailler avec des grades de pureté supérieure. Les produits "deposition grade, ⩾98%, ⩾99.9%" et "HPLC grade ⩾99%" présentent d'après le EEM moins de résidus polluants. La possibilité de distiller le TMOS a été écartée en raison de la nature CMR du produit.

Un tel problème n'a pas été rencontré avec le TEOS. Les xérogels TEOS ayant une moins grande surface spécifique (250 à 300 m^2.g^{-1}), les formulations seront donc des compromis entre efficacité de capture de COV et fluorescence intrinsèque du matériau. En effet, la sensibilité de la fluorescence est telle que travailler avec des xérogels moins poreux est acceptable.

III.2.2.2 Formulations TEOS

Le taux de pertes en fluorescence est moins important avec une formulation TEOS qu'avec une formulation TMOS. Cependant il reste trop important pour prévoir des études complètes vis à vis de COV ou de bactéries. Afin de réduire encore la fluorescence, nous avons cherché à réduire le nombre de composés entrant dans la formulation, notamment en retirant le co-solvant, l'eau étant plus miscible avec le TEOS qu'avec le TMOS. Cette modification entraine des temps de gélification plus long. L'ajout d'HCl est testé afin de catalyser la réaction. Ce qui pose alors deux questions : d'une part introduire une nouvelle espèce risque de générer de la fluorescence parasite ; d'autre part il a été montré précédemment que la présence d'HCl interdit l'usage d'autres capteurs en parallèle.

III.2.2.3 Optimisation du protocole de synthèse

Une partie des polluants provient des produits de synthèse eux-mêmes, mais différentes autres sources de contamination peuvent être suspectées. En premier lieu l'environnement de synthèse. En effet, le laboratoire de chimie est, par nature et malgré la présence du système d'extraction, un espace où se trouvent quantité de produits chimiques. Il n'est pas surprenant qu'au milieu de ce panel, certains soient volatils et fluorescents. La salle blanche propose un environnement plus régulé et plus propre, permettant de limiter la présence de polluants environnementaux.

Par ailleurs, les cuves de moulages sont en polystyrène et fluorescent sous lumière noire. Ces cuves ne sont pas conçues pour stocker longuement les produits ni être mises à l'étuve, il est probable qu'une petite fraction des plastifiants diffuse de la cuve vers le xérogel lors de la gélification à 45°C à l'étuve.

Le tableau A.2 regroupe les différents paramètres pouvant jouer sur la fluorescence intrinsèque des xérogels.

Aléatoires	*Environnement*	Salle blanche	Laboratoire de chimie
	Contenant	Cuves en verre silanisées [9]	Cuves en polystyrène
Contrôlé	*Protocole*	Sans pré-hydrolyse	Avec Pré-hydrolyse

Tab. III.8 – **Paramètres de synthèses**

III.2.2.4 Récapitulatif des formulations testées en fluorescence

Six conditions de synthèse ont été testées (Tableau A.3), tous les séchages ont eu lieu en étuve à 45°C.

	Aléatoires		**Contrôle**
Conditions	*Environnement*	*Contenant*	*Protocole*
n°1	Laboratoire de Chimie	Cuves en polystyrène	Sans pré-hydrolyse
n°2	Laboratoire de Chimie	Cuves en verre silanisées	Sans pré-hydrolyse
n°3	Salle blanche	Cuves en polystyrène	Sans pré-hydrolyse
n°4	Salle blanche	Cuves en verre silanisées	Sans pré-hydrolyse
n°5	Salle blanche	Cuves en polystyrène	Avec Pré-hydrolyse
n°6	Salle blanche	Cuves en verre silanisées	Avec Pré-hydrolyse

Tab. III.9 – **Conditions de synthèse**

Différents paramètres ont été étudiés pour aboutir aux xérogels les moins intrinsèquement fluorescents : formulation, condition des synthèses de séchage et de stockage. Outre

les produits entrant dans la formulation, plusieurs paramètres jouent fortement sur la présence de polluant.

- L'environnement de synthèse : pour une même formulation les lots réalisés en salle blanche possède un pourcentage de perte moindre.
- Le temps de gélification : plus la gélification est courte, moins la pollution est importante.
- La nature des cuves de moulage : les taux de pollution sont beaucoup plus faibles dans les cuves en verre.

L'ensemble des formulations et des lots testés sont regroupés en annexe p.179. Deux duos formulations et protocoles conduisent à un pourcentage de perte en fluorescence de 0. Il s'agit de xérogels, 800µm, TEOS à fort taux en ABTES ayant préalablement subi une pré-hydrolyse. Le moulage s'est effectué dans des cuves en verres.

Or l'utilisation de cuves en verre est, en soit, un facteur limitant en termes de production de xérogels. D'une part nous ne disposons que de huit cuves en verres destinées à la synthèse, qui impliquent des lots très réduits ; ce qui empêche de respecter le principe selon lequel l'ensemble des xérogels d'une exposition (à des COV chimiques ou à des bactéries) doit provenir du même lot. D'autre part, une production de huit xérogels par semaine ne permet pas d'envisager un nombre d'expérimentations suffisant. Travailler avec les mêmes formulations dans des cuves en polystyrène conduit à des pourcentages de perte plus importants, mais qui restent acceptables au vu de la quantité de xérogels produits. C'est donc cette solution qui sera retenue pour la suite des synthèses destinées à la détection par spectrométrie de fluorescence.

Pour obtenir des xérogels non fluorescents intrinsèquement, il convient d'être extrêmement soigneux lors du séchage. Les xérogels sont stockés individuellement dans des piluliers rodés, sous argon et parafilmés. Avant toute mesure, il convient de vérifier que le xérogel n'a pas été contaminé durant le stockage. Il a été constaté que les xérogels secs étaient peu fluorescents mais que s'ils étaient pollués, la fluorescence parasite redevenait visible après une simple exposition à l'eau.

Avant toute exposition à un COV ou à un milieu bactérien, les xérogels sont, au préalable, exposés une nuit à l'eau dans un pilulier parafilmé. Si leur fluorescence intrinsèque demeure négligeable, les xérogels peuvent alors être testés vis-à-vis d'un milieu d'intérêt.

Ce protocole permet d'une part d'éviter la transition opaque pendant les expérimentations et d'autre part de vérifier que les xérogels ne sont pas intrinsèquement fluorescents.

La transition opaque est un phénomène qui intervient lorsqu'un xérogel passe d'un état sec à un état humide ou inversement. Pendant une période transitoire le taux d'humidité à l'intérieur du xérogel n'est pas homogène. Le gradient provoque l'opacité du xérogel.

Lorsqu'un xérogel est stocké à l'air, le taux d'humidité à l'intérieur des pores n'est pas toujours suffisant pour activer la fluorescence d'éventuels polluants présents dans la matrice.

III.2.2.5 Photoblanchiment pour diminuer la fluorescence intrinsèque post-synthèse

Le caractère fluorescent de certains xérogels témoigne de la présence de polluants. Afin de réduire la fluorescence parasite et d'obtenir un meilleur rapport signal / bruit, le photoblanchiment a été étudié.

Le photoblanchiment est une dégradation photochimique d'un fluorophore, de telle sorte qu'il ne puisse plus émettre en fluorescence. Ce phénomène est dû à des ruptures de liaisons covalentes dans le fluorophore ou par réaction de ce dernier avec des molécules du milieu environnant tel que le dioxygène. Plusieurs cycles d'excitation peuvent être nécessaires pour obtenir un blanchiment complet c'est-à-dire une extinction totale de la fluorescence. [107] [108]

Protocole de photoblanchiment

Les xérogels fluorescents sont exposés à un rayonnement UV. Deux dispositifs et trois longueurs d'ondes ont été testés. Le premier dispositif se caractérise par un volume important et fermé à λ_{ex} = 230 nm. Le second dispositif possède un volume nettement plus petit mais relativement ouvert, deux longueurs d'onde d'excitation ont pu être testées λ_{ex} = 254 nm et λ_{ex} = 365 nm.

Quatre durées d'exposition ont été testées selon la cinétique : 2 h, 8 h, 8 h x2 et 8 h x3. Logistiquement il n'était pas possible d'exposer les xérogels plus de 8 h de suite. Entre chaque exposition les monolithes sont replacés dans des piluliers rodés et parafilmés sous argon.

Impact de l'exposition aux UV sur la fluorescence

Quatre formulations dont les conditions de synthèse diffèrent, mais dont le pourcentage de perte est supérieur à 80%, sont traitées par photoblanchiment. Les résultats après traitement sont similaires pour l'ensemble des formulations (cf. Annexe). La figure III.26 présente les résultats pour une formulation TEOS/EtOH/H_2O/ABTES de ratio molaire 1/5/4/0,04 synthétisé au laboratoire de chimie dans des cuves de polystyrène dont $\%^{P}_{Fluo}$ = 100 % après synthèse. L'exposition des xérogels à λ_{ex}= 365 nm n'a aucun effet sur la fluorescence intrinsèque. L'exposition à λ_{ex}= 254 nm conduit à une diminution du pourcentage de perte après trois cycles de 8 h. Enfin, exposer les xérogels à P_1 : λ_{ex} = 230 nm conduit à une diminution du pourcentage de perte dès 8 h d'exposition. Cependant après trois cycles de 8 h seulement, 40% du lot de xérogels est exploitable.

L'effet du photo blanchiment est plus important sur les monolithes de plus faible épaisseur. En effet, les UV pénètrent la couche externe du matériau sans atteindre le cœur et

seule une partie des molécules fluorescentes parasites a donc été impactée. Plus le matériau est épais moins cette proportion est importante. Par ailleurs, il pourrait apparaitre intéressant de travailler uniquement avec la surface du xérogel, mais nous serions alors confrontés à la redistribution de fluorescence *a posteriori* c'est-à-dire après l'homogénéisation du matériau.

Le photoblanchiment s'avère être une piste difficile à mettre en œuvre pour diminuer la fluorescence des xérogels post-synthèse. L'ajout d'une étape supplémentaire relativement longue n'est pas stratégique, aussi nous nous sommes concentrés sur l'élaboration de formulations directement moins fluorescentes.

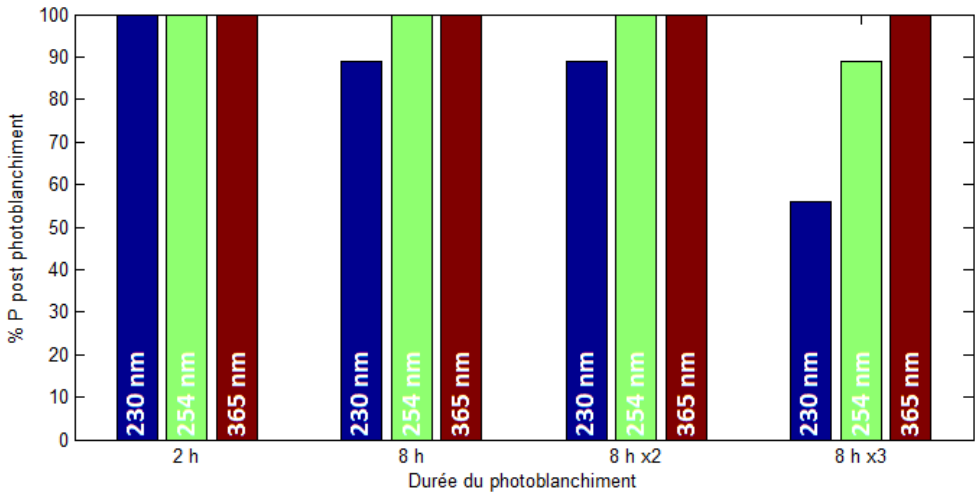


Fig. III.26 – Étude de l'impact d'une exposition prolongée des xérogels aux UV pour une formulation TEOS/EtOH/H_2O/ABTES de ratio molaire 1/5/4/0,04 dans les conditions 1. Seul le protocole de photoblanchiment à 230 nm permet, après trois cycles de 8 h, de photoblanchir 40 % des xérogels traités. Les autres protocoles conduisent à des performances encore plus faibles. P_1 : λ_{ex} = 230 nm ; P_2 : λ_{ex}= 254 nm ; P_3 : λ_{ex}= 365 nm

III.2.2.6 Calcination pour diminuer la fluorescence intrinsèque post-synthèse

L'une de voie les plus pertinentes pour produire des xérogels intrinsèquement fluorescents reviendrait à modifier en profondeur la structure de nos matériaux. Il s'agirait, en effet, d'ajouter une étape de calcination. Par ce biais une silice purement inorganique serait obtenue avec une auto-fluorescence très faible. [55] Un test préliminaire a été effectué en ce sens. Les figures III.27 et III.28 présentent deux xérogels de la même formulation. Le monolithe a) (Figure III.27) n'a pas subi de calcination tandis que le xérogel b) a été exposé à une température de 1000°C pendant 24 h. Il présente l'aspect typique d'une céramique, et s'il n'est pas fluorescent, son aspect a considérablement été modifié.

Par ailleurs, le frittage qui a lieu lors de ce procédé entraine une densification du matériau qui n'est pas souhaitable pour l'obtention de grande surface spécifique.

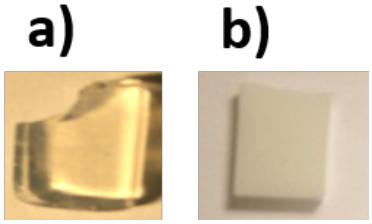


Fig. III.27 – **Xérogels TMOS/ABTES$_{1/0,15}$**. a) monolithe non calciné, b) xérogel calciné

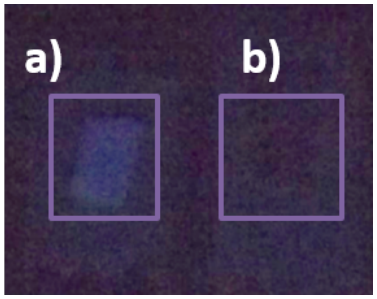


Fig. III.28 – **Xérogels TMOS/ABTES$_{1/0,15}$ en lumière noire (254 mn)**. a) monolithe non calciné, b) xérogel calciné

III.2.3 Étude de COV générés chimiquement

Parmi les COV bactériens fluorescents, l'indole et le naphtol vont nous servir de COV modèles pour la phase d'étude sur composés générés chimiquement. En effet, l'indole est un marqueur endogène bien connu d'*E.coli* tandis que le naphtol est un COV exogène révélant certaines activités enzymatiques, dont α-glucosidase et β-galactosidase en sont deux exemples.

Ainsi la littérature donne pour l'indole λ_{ex}=284nm / λ_{em}=300nm tandis que celui du β-naphtol est λ_{ex}=320nm / λ_{em}=410nm. [109] [110]

III.2.3.1 Études en milieu liquide de la fluorescence de l'indole et du β-naphtol

Des solutions aqueuses à 10 $^{-3}$ mMol.L^{-1} d'indole et de β-naphtol sont analysées par spectrométrie de fluorescence. Ces solutions sont tamponnées à pH = 7, en effet les milieux biologiques cibles ont des pH proches de 7. La présence du tampon oblige à contrôler la fluorescence intrinsèque de ce dernier, aussi des mesures sont également effectuées sur la solution tampon. Enfin à titre comparatif, une solution d'2-NP à 20 mMol.L^{-1} est également analysée.

La figure III.29 illustre les résultats obtenus. Sur les cartes EEM, le MES et l'oNP apparaissent comme attendus c'est-à-dire comme non fluorescents à l'inverse de l'indole et du β-naphtol. Les motifs de fluorescence formés par ces derniers composés sont similaires, il s'avère difficile de les différencier.

Deux analyses complémentaires ont été effectuées avec des solutions respectivement à 10 $^{-2}$ mMol.L^{-1} et 10 $^{-4}$ mMol.L^{-1} d'indole ou de β-naphtol. Les EEM obtenues possèdent le même motif de fluorescence que ceux issus de solutions à 10 $^{-3}$ mMol.L^{-1}. Seule différence, dans le cas des solutions à 10 $^{-4}$ mMol.L^{-1} l'intensité diminue légèrement.

S'il n'est pas possible de distinguer deux COV bien connus, il s'avère *a priori* encore moins probable d'analyser l'ensemble des métabolites volatils d'une bactérie.

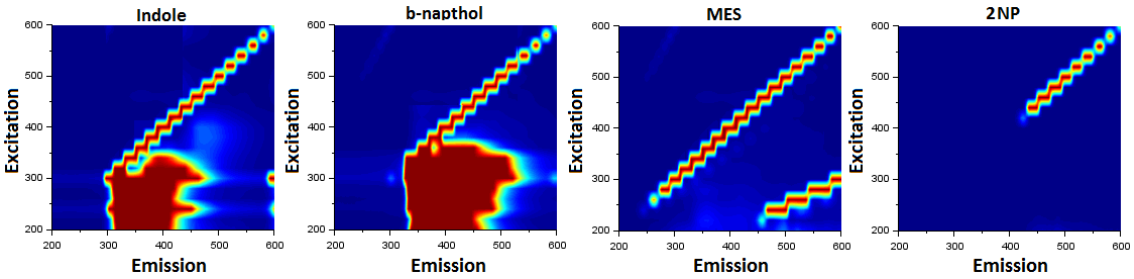


Fig. III.29 – EEM obtenues (300-600 nm) pour des solutions aqueuses tamponnées. De gauche à droite Indole, β-naphtol, tampon seul (MES), 2-NP

Remarque : Les EEM de l'indole et du β-naphtol présentent des signaux de fluorescence pour des longueurs d'onde où l'excitation serait moins énergétique que l'émission. Il s'agit en réalité d'un effet non linéaire au photomultiplicateur lorsque celui-ci est saturé. Deux photons d'énergie proportionnelle λ_0 sont considérés comme un seul photon d'énergie proportionnelle à $\frac{\lambda_0}{2}$.

III.2.3.2 Cinétiques de détection de l'indole et du β-naphtol

Le lot S118-B ayant conduit à taux de pertes relativement faible, nous disposons de suffisamment de xérogels pour réaliser deux pseudo-cinétiques [10], afin d'évaluer la cinétique de détection du β-naphtol et de l'indole.

L'exposition a lieu dans des tubes de 15 mL, à parti de 5 mL de solution à 10^{-3} mol.L^{-1} ce qui correspond à une valeur en ppb entre 0,4 et 88 ppb pour le β-naphtol et une valeur entre 0,3 et 740 ppb pour l'indole, selon les valeurs de constantes de Henry données par la littérature. Au préalable, la non-fluorescence de tous les xérogels est contrôlée après une nuit d'exposition à l'eau.

Remarque : Il est choisi de travailler en fonction de la concentration en phase liquide et non de la fraction en phase gazeuse. En effet, s'il est aisé de connaître la concentration en milieu liquide, la fraction en phase gazeuse est évaluée *via* les constantes de Henry. Or, d'une part sa valeur est valable dans des conditions précises (elle est le plus souvent disponible à 20°C, alors que nous travaillons à 37°C) et d'autre part la littérature n'est pas homogène en termes de valeurs répertoriées.

Les figures III.30 et III.31 présentent les suivis de fluorescence obtenus sous forme d'EEM. Une heure après le début de l'exposition, les xérogels n°1 et n°4 sont retirés et

10. L'ouverture des récipients d'expositions entraine un bouleversement de l'équilibre osmotique. Aussi pour éviter d'introduire des aléas, il est préféré de placer plusieurs échantillons dans les même conditions et de les contrôler à des temps différents.

caractérisés, les xérogels n°2 et n°5 après 6 h, enfin les xérogels n°3 et n°6 après 24 h. Dans le cas des xérogels n°1,2,4 et 5, bien qu'il y ait eu perturbation de l'équilibre lors de l'ouverture des flacons, les monolithes sont réintroduits après la première caractérisation, afin d'être caractérisés de nouveau à 24 h. La caractérisation du xérogel n°5 à 24 h n'a pu être effectuée, ce dernier étant tombé dans la solution.

β-naphtol

Dès 1 h d'exposition une zone de fluorescence est visible (λ_{ex} = [240 ; 280 nm] // λ_{em} = [340 ; 360 nm]). Après 6 h d'exposition deux zones fluorescentes proches et de forte intensité sont visibles. (λ_{ex} = [240 ; 280 nm] // λ_{em} = [330 ; 400 nm] et λ_{ex} = [310 ; 330 nm] // λ_{em} = [340 ; 380 nm]). Une erreur de mesure est également visible dans la moitié supérieure de l'image. Cette erreur est due à la saturation du photomultiplicateur du spectromètre.[11] Après 24 h d'exposition, les deux zones de fluorescence ont fusionné et l'ensemble a gagné en intensité, de même que l'artefact. Les caractérisations à 24 h des xérogels n°1 et n°2, dont les atmosphères ont été perturbées au cours de l'exposition, révèlent des zones de fluorescence de même forme quoique moins intense pour le n°1.

L'ensemble de ces EEM est surprenant. En effet, selon la littérature, le couple λ_{em}^{max}-λ_{ex} du β-naphtol est λ_{em}^{max} = 410 nm - λ_{ex} = 320 nm. Or les zones de fluorescence ne sont pas centrées sur ce point, l'émission a globalement lieu à des longueurs d'onde plus faibles. [110]

Indole

Dès 1 h d'exposition une zone de fluorescence est visible (λ_{ex} = [240 ; 280 nm] // λ_{em} = [300 ; 340 nm]). Après 6 h d'exposition la zone fluorescente s'est décalée vers de plus grande longueur d'onde (λ_{ex} = [240 ; 280 nm] // λ_{em} = [340 ; 390 nm]). L'artefact de mesure se distingue dans la moitié supérieure de l'image. Après 24 h d'exposition, la zone de fluorescence s'est considérablement accrue (λ_{ex} = [240 ; 320 nm] // λ_{em} = [300 ; 450 nm]) et a gagné en intensité, idem pour l'artefact. A 24 h la caractérisation du xérogel n°4 montre un carré de fluorescence très intense (λ_{ex} = [240 ; 280 nm] // λ_{em} = [340 ; 390 nm]).

11. Éteindre l'appareil 1 h permet de mettre fin à ce phénomène

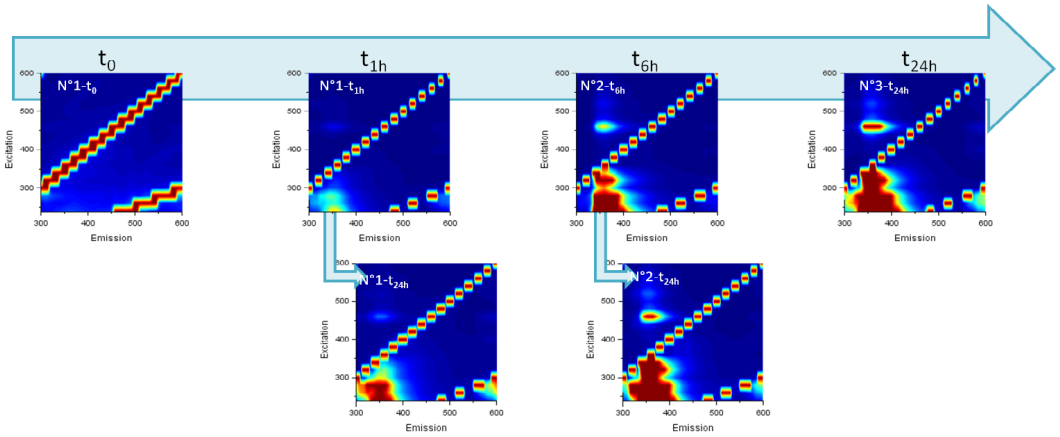


Fig. III.30 – **Détection du β-naphtol** par spectrométrie de fluorescence suivant une pseudo-cinétique à 1 h, 6 h et 24 h. Bien que les atmosphères des monolithes n°1 et n°2 aient été perturbées par l'ouverture des flacons lors de la première mesure, les expositions sont poursuivies jusqu'à 24 h. Le motif du xérogel n°2 à 24 h est similaire à celui du n°3 uniquement caractérisé à 24 h : dont l'atmosphère n'a pas été perturbée au cours de la pseudo cinétique. (λ_{em}, λ_{ex} {300-600 nm})

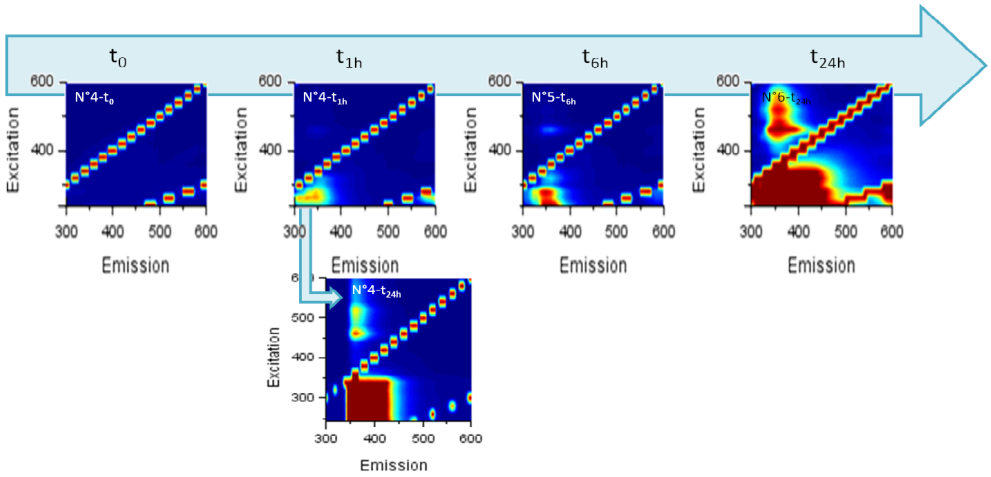


Fig. III.31 – **Détection de l'indole** par spectrométrie de fluorescence suivant une pseudo-cinétique à 1 h, 6 h et 24 h. Bien que l'atmosphère du monolithe n°4 ait été perturbée par l'ouverture du flacon lors de la mesure à 1 h, l'exposition est poursuivie jusqu'à 24 h. Le motif du xérogel n°4 à 24 h est moins étendu que celui du n°6 uniquement caractérisé à 24 h et dont l'atmosphère n'a pas été perturbée au cours de la pseudo cinétique. λ_{em}, λ_{ex} {300-600 nm})

Conclusion sur la détection de COV générés chimiquement *via* une représentation de fluorescence 2D

La détection par spectroscopie de fluorescence de COV générés chimiquement *via* des matrices sol-gel confirme nos craintes de ne pas distinguer les COV entre eux. En effet, pour les deux COV modèles testés, le constat est le même : une zone de fluorescence est bien observée au cours de l'exposition mais elle ne correspond pas aux signaux attendus. L'exposition préalable à l'eau pendant une nuit et le contrôle de non-fluorescence qui s'en

suit montrent cependant que l'apparition de la fluorescence est bien liée à la présence de COV.

La comparaison des zones de fluorescence en milieu liquide et en milieu xérogel montrent des situations différentes. En milieu liquide les zones de fluorescence englobent le point attendu, ce qui n'est pas le cas au sein des xérogels. Cette différence de comportement met donc en évidence que notre hypothèse de considérer les xérogels comme des réservoirs liquides et aqueux est simpliste : certes elle fonctionne bien en absorbance mais elle n'est plus valide en fluorescence.

Les effets du pH sur les spectres d'absorbance et de fluorescence dépendent des propriétés acido-basiques des molécules à l'état fondamental et à l'état excité. La reprotonation, après photoéjection est ainsi en lien direct avec le pH environnant.

Or dans le cas du β-naphtol, pKa*=2,8 [12] (pour rappel pKa=9,2), la littérature montre qu'entre pK* et pK, les formes acides et basiques coexistent relaxant chacune selon des rendements quantiques et longueurs d'onde qui leur sont propres ($\lambda_{em}(\beta\text{-NO}^-)$ =415 nm et $\lambda_{em}(\beta\text{-NOH})$ =360 nm pour une excitation à 300 nm). [106] Le pH équivalent de nos matériaux se trouvant entre ces deux valeurs pK et pK*, nous sommes donc en présence de molécules de β-naphtol dans des états de protonation différents selon les pores. Ce qui entraine une grande dispersité du signal. Afin de réduire cette dispersité, il apparait intéressant de fonctionnaliser la surface de manière homogène et contrôlée afin de favoriser grandement l'une des deux formes de la molécule.

Plusieurs phénomènes complémentaires peuvent entrer en jeu pour expliquer le décalage d'émission en fluorescence.

A l'échelle des nanopores, les longueurs caractéristiques (longueur de Debye par exemple) sont de l'ordre de grandeur des pores. La notion de liquide n'est pas adaptée car il s'agit de fluides confinés dont les comportements physiques et thermodynamiques diffèrent du comportement d'un fluide à l'échelle macroscopique. Au sein des nano-réacteurs, l'effet de polarisation est très différent de ce qui ce passe à l'état liquide proprement dit. La nanofluidique décrit le phénomène de polarisation interfaciale. [69] Ce phénomène, présent à l'échelle locale induit une grande discontinuité. Ces discontinuités placent les molécules présentes à l'intérieur des pores dans des états vibrationnels, entrainant des effets de relaxation distincts de ceux ayant lieu dans un liquide.

Par ailleurs, lorsqu'elles rentrent en contact avec la silice, les molécules d'eau forment des groupes silanol. Le pKa de silice est compris entre 2 et 4,5. Par conséquent, en présence de molécules d'eau, les groupes silanol sont sous forme déprotonée, ce qui entraîne la formation de charges négatives sur la surface de la silice. Les ions présents dans les pores et chargés positivement s'accumulent à côté de la surface, protégeant efficacement la

12. pKa à l'état excité

charge de surface négative sur la distance de la longueur de Debye. Les COV piégés dans cette zone du matériau sont donc dans un état de protonation particulier.

Il est à noter que la surface de pores de nos matériaux n'est pas chimiquement homogène, du fait de la présence de groupements fonctionnels. Les groupements, aminés principalement utilisés pour la fonctionnalisation de nos matériaux conduisent à un pH équivalent avoisinant 7-8, ce qui induit localement des phénomènes différents.

III.3 Conclusion sur l'analyse d'un profil olfactif bactérien global

Nous nous sommes intéressés à deux modes de transductions optiques pour la détection globale du profil olfactif formé par les COV endogènes d'une bactérie.

L'absorbance a été étudiée sous la forme d'un Nez artificiel, composé de différents capteurs xérogels dopés avec des molécules chimio-sensibles. Les trois types d'exposition, COV chimique, cultures bactériennes en milieu simple et cultures bactériennes en milieu complexe, ont démontré que pour la plupart, les molécules sondes étaient trop stabilisées au sein des pores du xérogels pour réagir avec les COV. Les seuls xérogels, ayant changé d'état, sont les monolithes de types acido-basiques.

Il est probable qu'il s'agisse d'une détection de l'acide carbonique, formé par la réaction de l'eau sur le dioxyde de carbone, COV émis par de très nombreuses bactéries.

L'information apportée par les transformations chimiques du Nez est donc trop pauvre pour que l'analyse par composantes principales permette de caractériser les COV présents et d'élaborer une base de données en vue d'un apprentissage supervisé.

La spectrométrie de fluorescence était une voie séduisante pour réaliser la mise en place de profils olfactifs bactériens *via* les cartes d'émission - excitation de fluorescence. Cependant deux limites à cette méthode ont été mises en évidence. D'une part l'obtention de xérogels intrinsèquement non fluorescents s'avère complexe. A ce stade la meilleure approche, pour continuer dans la synthèse de xérogels destinés à la spectrométrie de fluorescence, serait la mise en place d'un espace dédié et contrôlé à la production et au stockage des xérogels. D'autre part les motifs de fluorescence ne sont pas attribuables distinctement aux COV.

Par ailleurs un comportement différent des molécules d'indole ou de β-naphtol, a pu être mis en évidence selon que les molécules sont en solution aqueuse ou à l'intérieur de pores. Si l'hypothèse que les pores sont en partie remplis de molécules d'eau n'est pas réfutée, les interactions entre les molécules de COV et les constituants du matériau n'apparaissent plus négligeables.

L'analyse globale du profil olfactif d'une bactérie s'avère une étude ardue et un mode de détection extrêmement complexe à élaborer. Pour mettre en place une analyse mul-

tiparamétrique des pathogènes microbiens, plus simple de mise en œuvre, nous laissons de côté la prise en compte de l'ensemble des COV endogènes d'une bactérie, pour cibler quelques COV précis (endogènes ou exogènes) *via* des capteurs dédiés. C'est à partir de la combinaison de ces duos COV-capteurs spécifiques qu'il sera possible de construire une réponse multiparamétrique.

Chapitre IV

Détection multiparamétrique à partir de COV ciblés

IV.1 Sélection des COV cibles et des modes de transductions liés

Nous avons vu précédemment que l'analyse globale des COV émis par les bactéries n'était pas suffisamment caractéristique. Or il est possible de faire un parallèle entre la libération d'un COV dans des conditions données et la présence d'une bactérie particulière. Nous nous sommes donc intéressés à la détection de COV ciblés.

Ce chapitre présente la détection ciblée de trois bactéries d'intérêt en agroalimentaire *Escherichia coli* (*EC28* et *EC10*), *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis* (*SE87*) et *Staphylococcus aureus* (*SA71*).

Les bactéries, de par leur métabolisme, sont amenées à libérer des métabolites spécifiques dans des conditions normales de croissance. Les COV endogènes tels que ceux analysés dans les chapitres précédents font partie de ces métabolites spécifiques. Il est également possible d'ajouter aux milieux de culture des substrats enzymatiques spécifiques libérant des COV aux propriétés optiques intéressantes. Nous avons donc, dans cette partie de l'étude, combiné différents modes de détection :

— Détection de COV endogènes, en absorbance avec et sans sonde spécifique, ainsi qu'en fluorescence sans sonde.
— Détection de COV exogènes ciblés *via* la mise en place de voies enzymatiques, en absorbance sans sonde et en fluorescence sans sonde.

La détection de bactéries par COV exogènes repose sur la capacité de la bactérie à cliver préférentiellement le substrat enzymatique, ce qui libère un COV spécifique. Le clivage dépend du substrat, il est donc nécessaire d'identifier, pour chaque type de bactérie, un substrat approprié qui permet un clivage préférentiel pour la bactérie sélectionnée tout en libérant un COV caractéristique. De plus ce COV doit posséder des propriétés optiques

intéressantes.

Afin d'évaluer l'efficacité relative des méthodes de détection considérées, nous avons étudié en parallèle des modes de détection distincts. La figure IV.1 présente les bactéries ciblées (*EC28*, *SE87* et *SA71*) ainsi que leur mode de détection tandis que le tableau IV.1 précise les constantes de Henry [1] des COV caractéristiques pour ces bactéries.

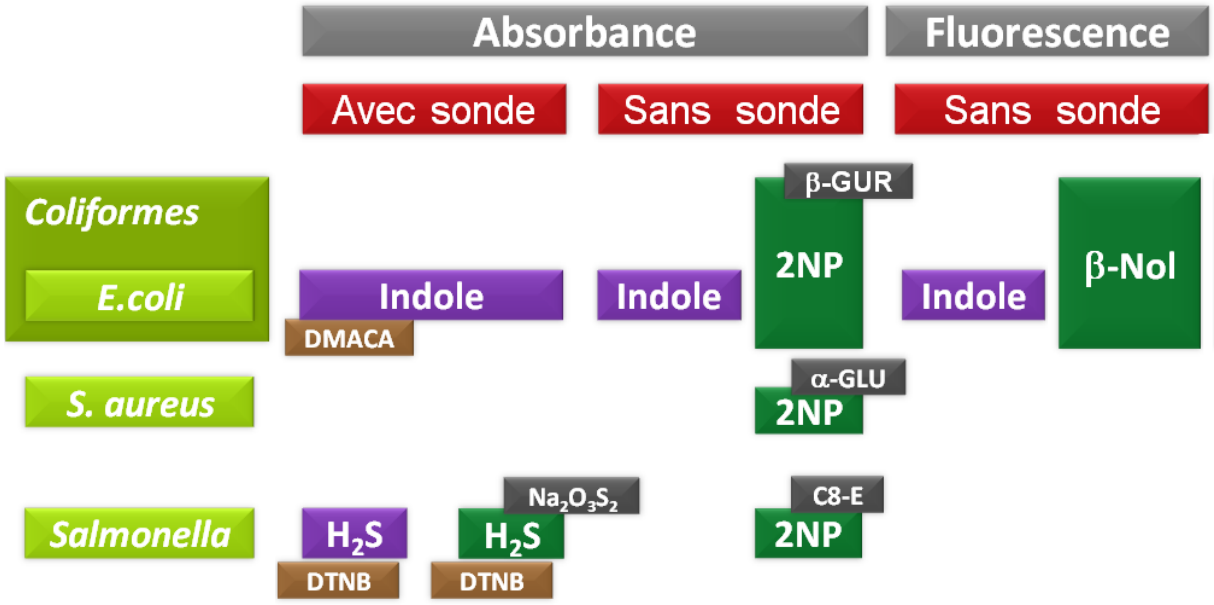


Fig. IV.1 – **Modes de détection associés à trois bactéries courantes *E.coli*, *S.aureus* et *Salmonella*.** Les cadres violets et verts indiquent respectivement les COV endogènes et les COV exogènes. Les cadres marrons précisent les éventuels réactifs nécessaires aux réactions spécifiques. Les cadres gris présentent les voies enzymatiques utilisées. β**-GUR** : β-glucuronidase, α**-GLU** :α-glucosidase, **C8-E** : C8-estérase et β**-GAL** : β-galactosidase.

1. La loi de Henry affirme que "à température constante et à l'équilibre, la quantité de gaz dissout dans un liquide est proportionnelle à la pression partielle qu'exerce ce gaz sur le liquide". Cela permet d'évaluer la quantité de COV présente en phase gazeuse à l'équilibre au-dessus du liquide. La constante de Henry est ici exprimée sans unité. L'annexe page 193 détaille les calculs de quantité de COV en phase gazeuse.

	COV	Hcc_{max}	Hcc_{min}	Mode de détection	Longueurs d'ondes d'intérêt
Endogène	**Indole**	$5{,}63^{-3}$	$2{,}11.10^{-5}$	Abs	λ_{max} = 270 nm
				Abs avec sonde	λ_{max} = 624 nm
				Fluo	λ_{ex} = 280 nm - λ_{em} = 320 nm
	H_2S	2,45	$2{,}45.10^{2}$	Abs avec sonde	λ_{max} = 412 nm
Exogène	**2-NP**	$6{,}51.10^{4}$	$5{,}06.10^{4}$	Abs	λ_{max} = 415 nm
	2-naphtol	$5{,}71.10^{4}$	$2{,}35.10^{5}$	Fluo	λ_{ex} = 320 nm - λ_{em} = 360 nm

Tab. IV.1 – **Propriétés physico-chimiques des COV ciblés**, leurs modes de détection ainsi que le pathogène microbien associé. **Hcc**, constante de Henry, s'exprime sans unité. Les différentes transductions sont : **Abs** : absorbance sans sonde ; **Abs avec sonde** : absorbance avec sondes spécifiques ; **Fluo** : fluorescence

IV.2 Détection en absorbance avec sondes spécifiques : cas de la détection de l'indole

Cette partie aborde la détection ciblée de COV endogènes. Deux cas d'applications concrètes sont à l'étude. D'une part la détection de *E.coli via* son COV caractéristique l'indole et d'autre part *Salmonella via* H_2S. La détection de l'indole en absorbance avec sonde spécifique est détaillée ci-après, tandis que la mise en place de capteurs H_2S a fait l'objet de travaux antérieurs en matrice TMOS et d'un transfert en matrice TEOS détaillé au chapitre II. [111]

E.coli est la bactérie la plus étudiée. Elle fut la première bactérie dont l'ADN fut séquencé. Si la plupart des *E.coli* sont à priori non pathogènes, il existe néanmoins un intérêt réel à détecter cette espèce. En effet, la réglementation de la pharmacopée impose des normes strictes de stérilité. Sur un produit de classe A la stérilité est constatée si aucune bactérie dont *E.coli* n'est détectée dans un volume donné. Pour d'autres types de produits comme certaines catégories de viandes c'est la numération qui s'avère réglementée. En effet, un seuil de 500 ufc.g^{-1} d'*E.coli* est toléré pour de la viande crue telle que des saucisses destinées à être cuites avant consommation.

La plupart des familles *E.coli* émettent de l'indole. Ce COV peut être détecté *via* des réactions sonde-cible, mais la seconde partie de ce chapitre montre qu'il est également possible d'envisager une détection sans sonde.

IV.2.1 Les réactions sondes-cibles

La littérature présente deux composés organiques usuellement employés comme molécules sondes, pour la détection de l'indole :

— p-DiMéthylAminoCinnamAldehyde : DMACA
— p-DiMéthylAminoBenzAldéhyde : DMABA

Historiquement ils sont utilisés pour l'identification rapide des bactéries contenant des systèmes enzymatiques tryptophanases produisant de l'indole. Les réactions covalentes sondes-cibles mises en jeux nécessitent une acidité élevée, pour cela l'acide chlorhydrique est couramment utilisé comme catalyseur. Le DMACA favorise une cinétique de détection plus rapide. [49]

La réaction DMACA-indole

En solution aqueuse très acide pH<2, la réaction DMACA-indole peut donner lieu à la formation de deux composés obtenus à travers deux réactions consécutives (figure IV.2). [112] Lors que la concentration de DMACA est en excès le composé I, le chlorure d'azafulvénium ($\lambda_{max} = 623$ nm - $\varepsilon_{623} = 97\,000$ L.mol^{-1}.cm^{-1}) est obtenu majoritairement. Lorsque la concentration d'indole est en excès devant celle de DMACA, il a été montré que les deux composés se formaient instantanément puis que le composé I disparaissait au profit du composé II ($\lambda_{max} = 547$ nm). Si l'acide est en excès, le composé II devient instable et disparait au profit d'un composé III absorbant à 338 nm.

Il est important de tenir compte de ces phénomènes pour ne pas faire d'erreur d'interprétation. La formation du composé I, chlorure d'azafulvenium, est à privilégier pour notre étude car les composés II et III absorbent à des longueurs d'ondes proches de celle du DMACA neutre ($\lambda_{max} = 383$ nm).

A partir de ces résultats en milieu liquide, une formulation de xérogels contenant le composé DMACA a été mise au point (Tableau IV.2). [112] Cette formulation a permis la discrimination de bactéries indole-positives et indole-négatives.

La nécessité de se placer à pH très acide (inférieur à 2) a induit l'introduction de l'acide chlorhydrique comme catalyseur au sein de la formulation. Or la volatilité de l'acide chlorhydrique est doublement limitante :

— D'une part, à température ambiante, les matrices perdent rapidement leur caractère acide donc leur sensibilité. Cette déprotonation du DMACA se traduit visuellement par une coloration orangée puis rouge. Pour éviter ce phénomène, l'une des parades est de conserver les xérogels à froid.
— D'autre part, le relargage continu d'acide interdit l'utilisation en parallèle d'autres capteurs, de type acido-basique par exemple.

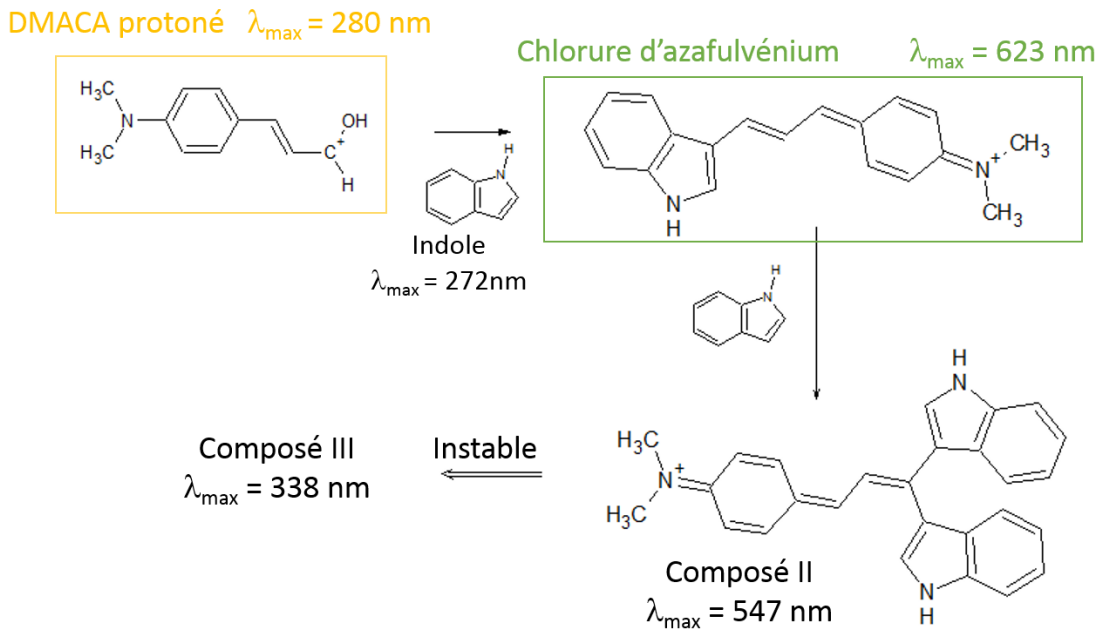


Fig. IV.2 – **Réaction Indole-DMACA en milieu acide**. L'indole réagit avec la forme protoné du DMACA pour former le chlorure d'azafulvenium (λ_{max} = 623 nm). Un excès d'indole conduit au composé II (λ_{max} = 547 nm) qui instable ce dégrade rapidement au profit d'une troisième composé (λ_{max} = 338 nm)

La figure IV.3 présente un xérogel de formulation DMACA-HCl (Tableau IV.2). Alors que les xérogels de ce lot étaient jaunes juste après séchage, ils sont rosés après deux semaines de stockage sous air dans un pilulier fermé à température ambiante. La couleur indique que les molécules de DMACA sont partiellement sous leur forme neutre.

Pour confirmer le relargage de l'acide chlorhydrique, un monolithe DMACA catalysé HCl est mis en présence d'un xérogel dopé au bleu de bromophénol (Formulation cf. chapitre III p. 81) initialement sous forme déprotonée. Au fur et à mesure de l'exposition, le xérogel passe d'une couleur bleue à une couleur jaune.

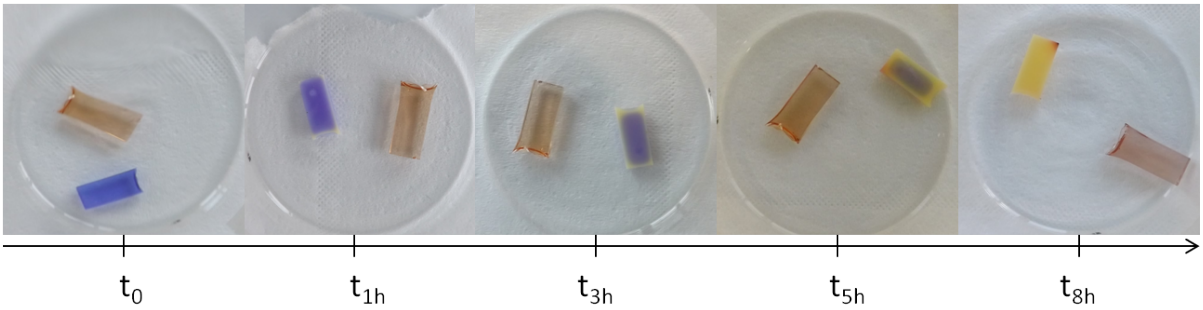


Fig. IV.3 – Relargage de l'acide chlorhydrique par un xérogel DMACA. Après deux semaines de stockage, une partie de l'HCl a été relargué. Le xérogel DMACA-HCl présente une déprotonation partielle. Le monolithe est passé d'une couleur jaune (DMACA protonée) à une couleur rosée. A t_0 le xérogel DMACA-HCl partiellement sous forme neutre est mis en présence d'un xérogel contenant du bleu de bromophénol sous forme déprotonée. Au cours de l'exposition, les molécules acido-basiques se protonnent passant du bleu au jaune.

Tab. IV.2 – **Formulation DMACA-HCl**

Formulation	Ratio molaire
TMOS	1
MeOH	5
DMACA	3,4
APTES	0,03
HCl	140
H_2O	4

Il nous est donc paru intéressant de retirer l'acide chlorhydrique des formulations pour permettre une détection multiple (c'est-à-dire de mettre un même échantillon simultanément en présence de plusieurs capteurs) et d'augmenter la stabilité du capteur.

Les caractéristiques des nouveaux xérogels doivent inclure, comme précédemment, des nanopores et une grande surface spécifique afin de permettre la capture de l'indole par le xérogel et de maximiser la surface de réaction.

IV.2.2 Formulation DMACA TFA

L'acide trifluoroacétique (TFA) est un acide carboxylique fort (pKa de 0,3). Cette acide possède une constant de Henry de $6{,}63.10^{-4}$, ce qui le rend beaucoup moins volatil que l"HCl. [113]

IV.2.2.1 Synthèse DMACA-TFA-ABTES et DMACA-TFA-n-butyl

Deux formulations DMACA, utilisant le TFA comme acide catalyseur pour la réaction DMACA-indole, ont été testées. La première formulation consistait en une simple substitution de l'acide chlorhydrique par de l'acide trifluoroacétique (TFA). Néanmoins, le TFA est un acide plus faible que l'acide chlorhydrique. Il n'était donc pas évident que l'acide contrebalance la nature basique de la matrice ABTES. Aussi une seconde formulation utilisant le n-butyl comme agent modificateur de structure est synthétisée (Tableau IV.3). Les protocoles de synthèse sont similaires au protocole décrit page 183, respectivement à -20°C pour l'ABTES et dans de la glace pour le n-butyl. Le DMACA étant soluble dans le méthanol, la molécule sonde est introduite *via* la phase alcoolique. Dans le cas de la formulation catalysée HCl, le séchage est effectué à température ambiante pour limiter l'évaporation de l'acide et ainsi la déprotonation de la molécule sonde. Le même mode de séchage est conservé pour les formulations catalysées par TFA.

Tab. IV.3 – **Ratio molaire des formulations D-TFA-ABTES et D-TFA-n-butyl**

Formulation	D-TFA-ABTES	D-TFA-n-butyl
TMOS	1	1
MeOH	5	5
DMACA	3,4	3,4
ABTES	0,03	0
N-buytl	0	0,03
TFA	0,15	0,15
H_2O	4	4

Les deux formulations donnent lieu à des temps de gélification et de séchage, beaucoup plus longs que pour des formulations incluant HCl. Or la présence d'acide catalyse la réaction sol-gel, cette différence de cinétique met en évidence le caractère moins acide du TFA par rapport à HCl. Le temps de gélification le plus long est obtenu pour la formulation n-butyl. Ce qui est cohérent puisque cette molécule ne porte pas de fonction catalysant la réaction sol-gel contrairement à l'ABTES qui porte des groupements amines. Les xérogels n-butyl présentent un fort rétreint en hauteur alors qu'il est très faible en largeur. De nouveau le caractère moins acide du TFA est mis en avant. En effet cette géométrie particulière des xérogels témoigne qu'une partie de l'évaporation des solvants a eu lieu avant gélification. Ce qui confirme une gélification plus lente. Les monolithes obtenus présentent de bonnes propriétés mécaniques, optiquement ils sont rouges transparents bien que foncés. Leur couleur indique que la majorité des molécules DMACA, présentes dans le xérogel, sont sous forme neutre et donc non réactives.

Un monolithe de chaque formulation est exposé à l'indole. Parallèlement un exemplaire de chaque formulation est mis en présence d'un monolithes de $BBP_{basique}$ afin de vérifier que les monolithes acidifiés ne relarguent pas de TFA.

Au cours de l'exposition, les monolithes ayant l'ABTES comme précurseur fonctionnalisé ne montrent pas d'évolution notable (Figure IV.4-b). Seule la forme neutre et donc non réactive du DMACA est visible. Le cas du xérogel de formulation n-butyl est plus intéressant. Visuellement, sa couleur évolue (Figure IV.4-a). De plus les spectres d'absorbance montrent la croissance d'un pic à 626 nm, longueur d'onde d'absorbance du chlorure d'azafulvénium, après 7h d'exposition. L'absorbance s'accentue au cours du temps comme en témoigne la courbe correspondant à une journée d'exposition. Si ce composé a pu se

former c'est qu'à t_0 une partie au moins des molécules DMACA du xérogel étaient bien sous forme protonée. Visuellement le xérogel est d'une couleur marron obtenue, ce qui ne permet pas une identification à l'œil nu. En effet, la couleur marron par réaction du DMACA peut signifier la formation de composés autres (tableau III.2 - Chapitre I p. 79) que le complexe d'azafulvénium. La lecture en absorbance est, donc ici, impérative pour différentier la réaction avec l'indole de la réaction avec d'autres interférants.

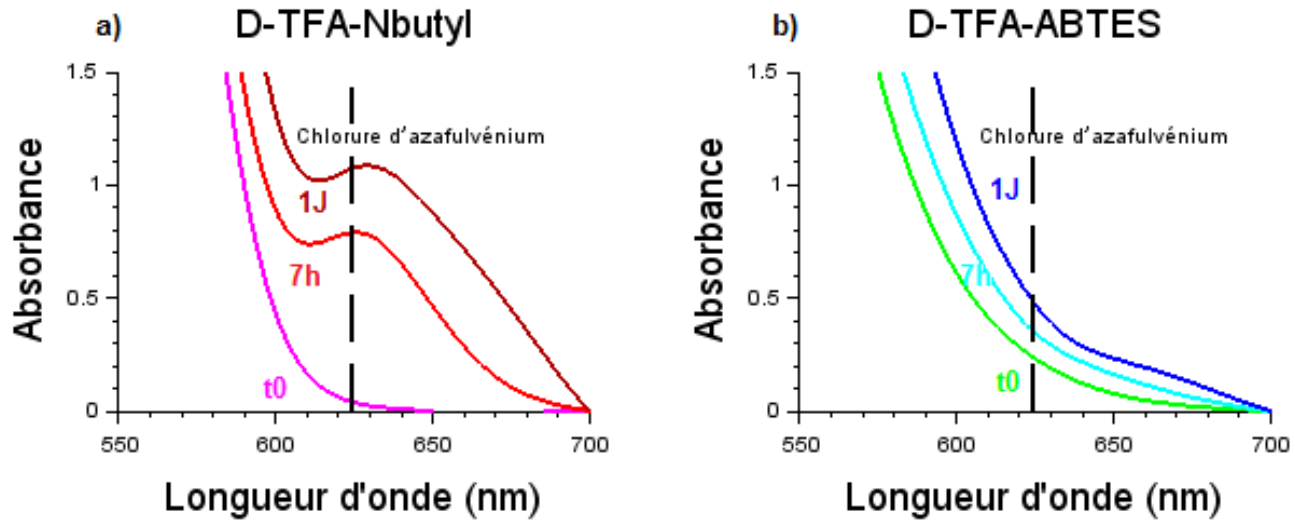


Fig. IV.4 – **Exposition de xérogels dopés DMACA et catalysés TFA à de l'indole**. a) précurseur fonctionnalisé : n-butyl b) précurseur fonctionnalisé : ABTES

Les photographies de la figure IV.5 montrent des xérogels dopés BBP dans une matrice basique après 24h d'exposition aux xérogels DMACA catalysés TFA. Les xérogels pHmétriques sont demeurés bleus. Cette couleur correspond à la forme déprotonée du BBP. A titre de comparaison, lors de la mise en présence de xérogels DMACA catalysés HCl, il ne fallait qu'une dizaine de minutes pour que cette formulation de xérogel acido-basique passe du bleu au jaune. Le relargage de TFA semble donc négligeable à ce stade.

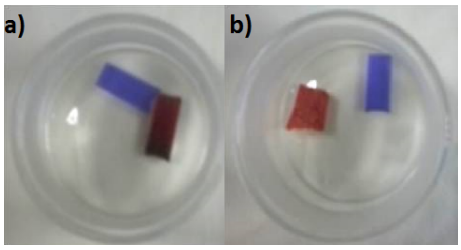


Fig. IV.5 – **Etude du relargage d'acide par les formulations catalysées par le TFA**. a) D-TFA-ABTES à 8 h. b) D-TFA-n-butyl à 8 h

La détection de l'indole *via* des xérogels DMACA catalysés TFA est donc possible, sans qu'il y ait de relargage d'acide, ce qui ouvre la possibilité d'un couplage entre les

capteurs DMACA-TFA et d'autres capteurs xérogels. Cependant, les formulations ne permettent pas une détection à l'œil nu, la spectrométrie reste nécessaire.

Par ailleurs, si la réaction DMACA-indole a bien eu lieu, la cinétique a été considérablement affaiblie. Lorsque cette réaction est catalysée par HCl, le temps de détection est de l'ordre d'une dizaine de minutes, tandis qu'elle a pris plusieurs heures sur xerogels DMACA catalysés TFA. Ce constat est cohérent avec le fait que la forme DMACA protonée est minoritaire au sein des xérogels, donc moins disponible pour la réaction sonde-cible. Les formulations ci-dessous visent à améliorer la cinétique de détection pour minimiser le temps d'analyse.

IV.2.2.2 Optimisation de la formulation DMACA catalysée TFA

Afin d'augmenter la vitesse de formation du composé d'azafulvénium, la première piste a naturellement été d'augmenter le ratio molaire de TFA par rapport à la formulation D-TFA-n-butyl. Le tableau IV.4 présente les formulations testées avec des ratios molaires de TFA allant de 0,5 à 2 contre 0,15 dans la formulation D-TFA-n-butyl. Les xérogels sont, de nouveau, synthétisés selon le protocole présenté en annexe page 183.

Tab. IV.4 – **Ratio molaire des formulations D-TFA-n-butyl-2, D-TFA-n-butyl-3, D-TFA-n-butyl-4 et D-TFA-n-butyl-5**

Formulation	D-TFA-n-butyl-2	D-TFA-n-butyl-3	D-TFA-n-butyl-4	D-TFA-n-butyl-5
TMOS	1	1	1	1
MeOH	5	5	5	5
DMACA	3,4	3,4	3,4	3,4
n-butyl	0,03	0,03	0,03	0,03
TFA	0,5	1	1,5	2
H_2O	4	4	4	4

Leur capacité à capter l'indole est testée en les exposant à des vapeurs d'indole solide ($\sim$ 15 ppm) ou à une solution aqueuse à 10^{-3} mol.L^{-1} ($\sim$ 400 ppb) suivant le protocole de l'annexe page 169. Les xérogels de ces lots étant majoritairement en éclat, seuls les spectres d'absorbance de quelques xérogels ont pu être réalisés et exploités.

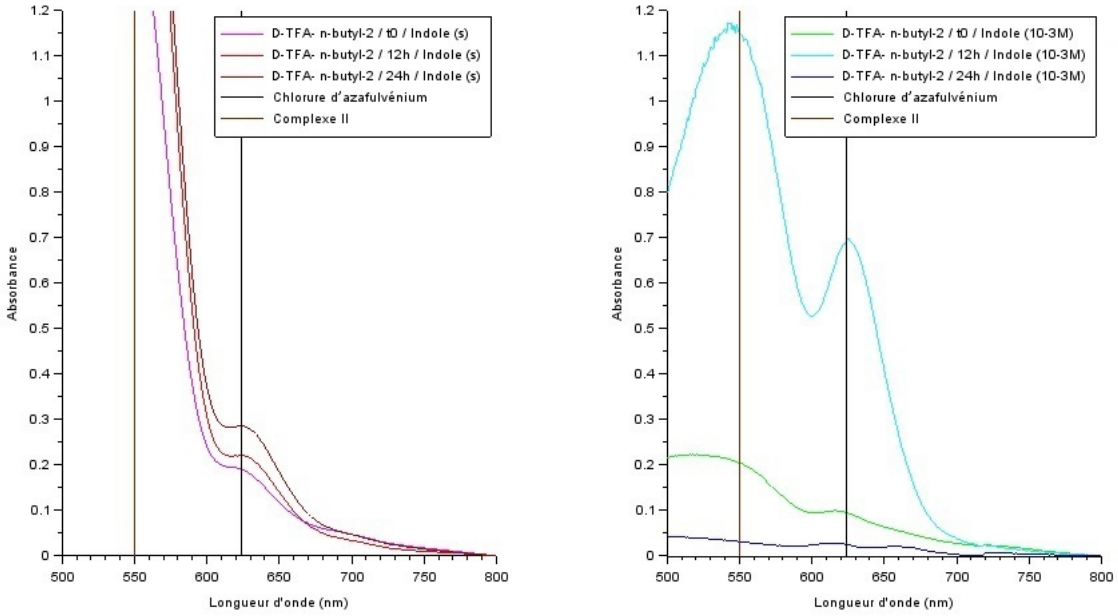


Fig. IV.6 – **Spectre d'absorbance de monolithes D-TFA-n-butyl-2** exposés à gauche à de la poudre d'indole solide ($\sim$ 15 ppm) ; à droite à une solution aqueuse d'indole à 10^{-3} mol.L^{-1} ($\sim$ 400 ppb)

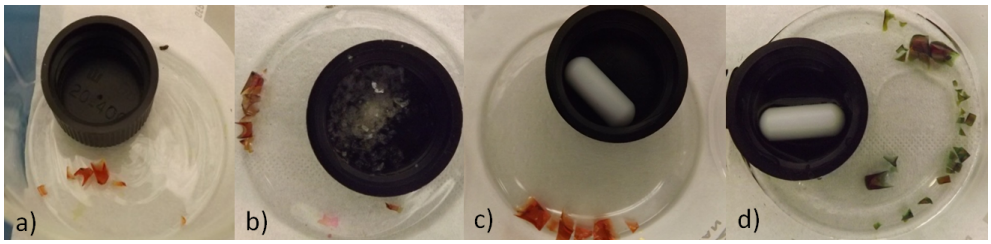


Fig. IV.7 – **Exposition de xérogels du lot D-TFA- n-butyl-3**. Les figures a) et c) correspondent à t_0 tandis que les figures b) et d) correspondent respectivement à une exposition de 12 h à de l'indole solide ($\tilde{1}5$ ppm) et à une solution aqueuse à 10^{-3} mol.L^{-1} ($\tilde{4}00$ ppb). La couleur verte, témoin de la formation du chlorure d'azafulvénium ,est observée uniquement dans le cas d'une exposition à la solution aqueuse.

Remarque : Les valeurs en ppb correspondent aux valeurs qui seraient obtenues pour des équilibres entre les phases gaz et liquide. Or le xérogel captant une partie de la faction de COV passée en phase gazeuse, l'équilibre n'est jamais atteint. Du COV migre continuellement en phase gazeuse qui augmente, par effet cumulatif, la quantité de COV piégés au sein du matériau. Les valeurs en ppb sont donc des outils de comparaison des conditions expérimentales mais ne correspondent pas à la réalité des teneurs en phase gazeuse au sein du matériau.

Les xérogels du lot D-TFA-n-butyl-2 passent d'une première couleur rouge à un rouge plus sombre en cas d'exposition à de l'indole solide et à un marron lors d'une expo-

sition à une solution aqueuse d'indole à 10^{-3} mol.L^{-1}). La figure IV.6 montre les spectres d'absorbance obtenus. A t_0 la formulation D-TFA-n-butyl-2 montre une absorbance à 550 nm. Cela avait déjà été observé pour les formulations précédentes. Plus surprenant, les xérogels absorbent aux alentours de 625 nm, ce qui est préjudiciable pour la détection du composé azoté. Le xérogel D-TFA-n-butyl-2, exposé au solide, voit une augmentation constante de l'intensité de ce dernier pic au cours du temps. Pour celui exposé à la solution aqueuse, l'augmentation de l'intensité du pic à 624 nm est plus rapide. Cependant, à 24 h, le xérogel est très humide et opaque, si bien que son spectre n'est pas exploitable.

Les photographies des éclats de xérogels D-TFA-n-butyl-3 (Figure IV.7) illustrent l'influence de l'humidité ambiante. En effet, alors que les xérogels exposés à l'indole solide ont pris une couleur marron, ceux exposés à l'indole en solution présentent visiblement une couleur verte caractéristique de la formation du chlorure d'azafulvénium. L'humidité est donc un facteur favorisant la réaction sonde-cible, ce qui est de bonne augure puisque les cultures bactériennes impliquent un taux d'humidité élevé.

Les autres formulations de xérogels conduisent, après exposition, à des éclats de couleur brune. Le xérogel D-TFA-n-butyl-4 ayant initialement une forme monolithique n'a pas résisté à l'humidité et s'est effrité.

La formulation D-TFA-n-butyl-3 a conduit aux meilleurs résultats. La couleur verte témoigne que la réaction a bien eu lieu, les éclats permettent une détection visuelle, mais empêchent une analyse par spectrométrie. Malheureusement, il n'a pas été possible d'obtenir des monolithes manipulables en augmentant le taux de TFA. Les éclats de xérogels visibles sur la figure IV.7 étaient quant à eux manipulables beaucoup plus aisément. Une épaisseur plus fine du matériau permet de diminuer les différentes conditions d'évaporation du solvant et de séchage entre la surface et le cœur du matériau, et donc d'obtenir un matériau plus homogène et plus manipulable.

Les monolithes de 800 µm, plus fins, sont donc le format à privilégier par la suite.

Le rapport signal-sur-bruit correspond au rapport entre les molécules ayant formé le composé d'azafulvénium et les molécules DMACA (protonées et neutres). Afin d'augmenter le contraste, il a été décidé de diminuer la quantité globale de molécules sondes.

L'hypothèse est que l'équilibre entre les molécules de DMACA protonées et neutres est régi par le pH intra-pore du xérogel. Lors de la réaction indole-DMACA au sein de la matrice, une part de molécules protonées est consommée. Le retour à l'équilibre permet de diminuer le rapport signal-sur-bruit.

Les formulations catalysées TFA présentent, pour la plupart, de forts taux de pertes mécaniques. Comme l'illustre la figure IV.7, les xérogels obtenus sont majoritairement des éclats.

Il est donc nécessaire de s'intéresser en parallèle à la tenue mécanique des matériaux afin d'obtenir des monolithes manipulables.

IV.2.3 Renforcement de la tenue mécanique des matériaux

Afin de renforcer la tenue mécanique des monolithes, deux stratégies ont été mises en œuvre. D'une part, l'incorporation d'un polymère afin d'obtenir une structure mécanique et de modifier la tenue mécanique. D'autre part, puisque les formulations DMACA-TFA ont montré un phénomène d'évaporation du solvant avant gélification, il est intéressant de tester un solvant moins volatil que le méthanol, donc dans ce cas précis d'étudier les formulations TEOS. Ces formulations sont certes moins poreuses mais l'homogénéité au sein du matériau (cf. chapitre II) laisse présager une meilleure tenue mécanique. De plus l'inclusion d'une molécule sonde (DTNB) dans ces formulations a déjà été effectuée et a conduit à des xérogels manipulables (cf. chapite II).

IV.2.3.1 Incorporation d'agent polymère

Le polystyrène sulfonate de sodium (PSS)

Le PSS est un polymère issu des polystyrènes dont les groupements phényls ont été substitués en para par un groupement sulfonate (Figure IV.8).

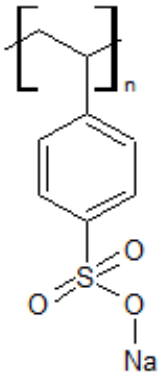


Fig. IV.8 – **Polystyrène sulfonate de sodium** (PSS)

L'ajout du PSS introduit au sein des xérogels un second système de nature organique, qui n'a à priori aucun lien physique avec les réseaux inorganiques.

Le PSS se présente sous forme d'une dispersion aqueuse. Il convient donc de prendre en compte cette quantité d'eau supplémentaire lors de la mise en place des formulations. Ces nouvelles formulations ont demandé une modification du protocole de synthèse. Le PSS aqueux et la quantité d'eau complémentaire sont mélangés pendant une minute (pour la formulation D-PSS-3, il n'y a pas eu d'eau supplémentaire ajoutée), puis le méthanol est ajouté. La solution est laissée sous agitation pendant 2 h à température ambiante avant de reprendre le protocole standard dans un bain de glace. La formulation D-PSS-3 présente des temps de gélification (t_G = 10 J) et de séchage (t_S = 15 J) particulièrement longs. Les xérogels obtenus sont monolithiques mais très fragiles.

Tab. IV.5 – **Ratio moléculaire des formulations D-PSS-1,D-PSS-2,D-PSS-3**

Formulation	D-PSS-1	D-PSS-2	D-PSS-3
TMOS	1	1	1
MeOH	5	5	5
n-butyl	0,03	0,03	0,03
DMACA	1	1	1
PSS	0,01	0,1	1
H_2O	4	4	13,9

L'exposition des xérogels à une solution à 10^{-3} mol.L^{-1} d'indole s'est effectuée en tube de 15 mL (Figure IV.9) selon une pseudo cinétique. La nécessité d'ouvrir le récipient d'exposition afin de procéder aux mesures perturbe l'équilibre de milieu et donc introduit un biais : la perte d'une fraction de COV à chaque ouverture. Pour remédier à ce problème des pseudos cinétiques peuvent être réalisées. Il s'agit de duplicata d'un même échantillon traités de manière identique qui seront caractérisés à des durées d'expositions différentes. Cette approche repose sur l'hypothèse qu'en partant d'une solution mère unique, chacune des fractions conduira à un temps donné, au même équilibre.

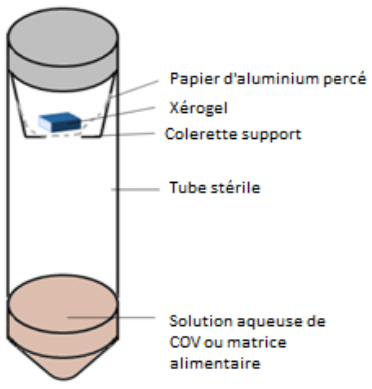


Fig. IV.9 – **Montage de l'exposition d'un xérogel en phase vapeur** au-dessus d'un liquide *via* un tube stérile de 15 mL.

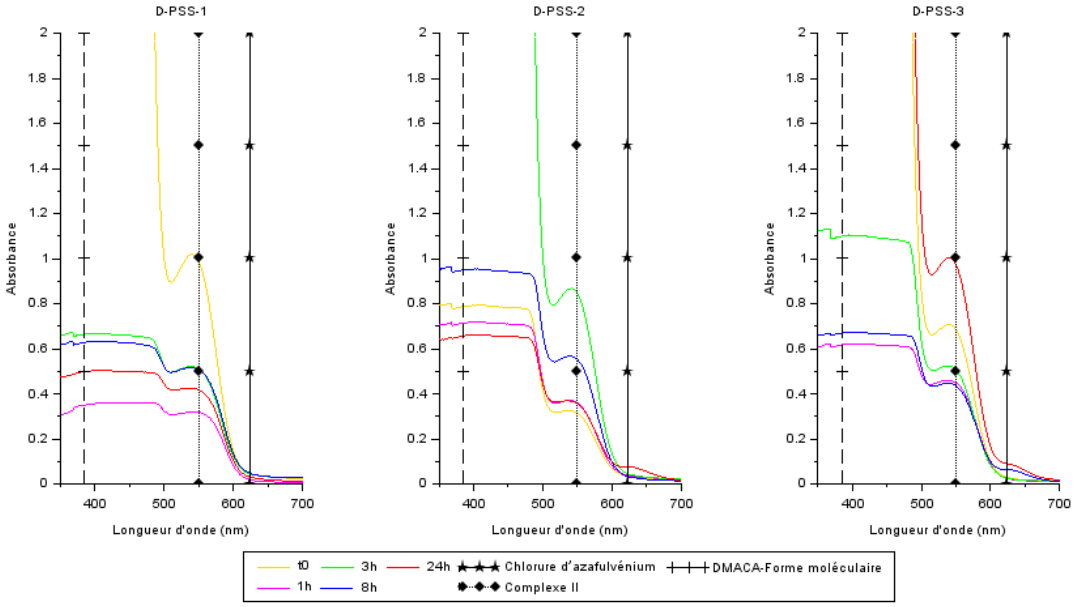


Fig. IV.10 – **Exposition de xérogels contenant du PPS à de l'indole.** Les formulations D-PSS-2 et D-PSS-3 montrent une légère bande d'absorbance à 550 nm respectivement à 24 h et 6 h

La figure IV.10 montre les spectres d'absorbance des trois formulations (D-PSS-1 D-PSS-2 et D-PSS-3) obtenus en pseudo-cinétique lors de l'exposition des trois formulations à de l'indole aqueux. L'ensemble des xérogels absorbe très fortement jusqu'à 500 nm, puis une bande d'absorbance est visible aux alentours de 550 nm. Il ne sera donc pas possible de détecter le second complexe formé par la réaction indole-DMACA. La formulation D-PSS-1 ne conduit à aucune évolution. Après 24 h d'exposition la formulation D-PSS-2 conduit à une bande d'absorbance aux alentours de 624 nm. La formulation D-PSS-3 conduit à la formation de la même bande d'absorbance en 8 h, son intensité évolue peu en 24 h.

L'introduction de PSS conduit à l'obtention de xérogels monolithiques permettant d'avoir une partie des molécules DMACA sous forme protonée et la formation du chlorure d'azafulvénium. Cependant, là encore, la détection requiert la spectrométrie d'absorbance et le temps de détection demeure bien plus long que dans le cas de xérogels catalysés HCl.

Formulation PSS catalysée TFA

Le TFA a prouvé sa capacité à catalyser la réaction indole-DMACA malgré sa cinétique lente. Les matrices, incorporant un taux important de PSS, se sont également révélées favorables à la réaction. Une formulation incorporant PSS et TFA (Tableau IV.6) a été développée pour combiner les deux effets.

Les xérogels ont été synthétisés comme précédemment. Ils s'avèrent extrêmement fragiles mais monolithiques, le taux de perte avoisine les 60% au démoulage et croît à 80% lors

des manipulations. Les xérogels ont été exposés à l'indole en solution (10^{-3} mol.L^{-1})(10^{-3} mol.L^{-1}) malgré leur fragilité mécanique pour identifier leur pseudo-cinétique.

La figure IV.11 présente les spectres d'absorbance de cette formulation. A t_0 le xérogel présente deux bandes d'absorbance, respectivement à 420 nm et 540 nm. Dès 2 h d'exposition une bande d'absorbance est visible aux alentours de 625 nm. Un déplacement du sommet du pic est visible vers 630 nm au cours du temps. Au vu des composés en présence, il apparait cependant probable que cette bande d'absorbance corresponde à la formation du chlorure d'azafulvénium.

Tab. IV.6 – **D-PSS-4**

Formulation	Ratio molaire
TMOS	1
MeOH	5
n-butyl	0,03
DMACA	1
PSS	1
TFA	1
H_2O	13,9

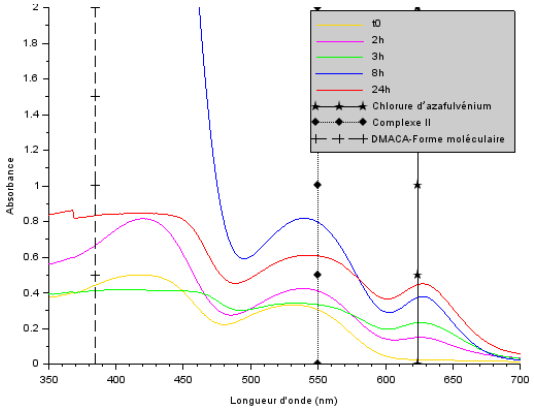


Fig. IV.11 – **Exposition de xérogels D-PPS-4 à de l'indole**, une bande d'absorbance à 550 nm est visible dès 2 h.

La formulation PSS catalysée TFA (D-PSS-4) permet de détecter la présence d'indole en 2 h. Les capteurs ne sont pas aussi performants que les xérogels catalysés HCl ; Cependant cela est acceptable pour l'application visée. Cette formulation présente deux inconvénients majeurs : les xérogels nécessitent d'être manipulés avec beaucoup de précaution, malgré une optimisation du séchage le taux de perte reste de 50% et ils ne sont pas aussi réactifs que les xérogels catalysés HCl.

IV.2.3.2 Comparaison des formulations TMOS et TEOS

Le chapitre II a montré que les xérogels TEOS étaient plus homogènes que les TMOS. Ils présentent donc *a priori* moins de risque de se fissurer ou de tomber en éclat lors de l'incorporation de molécules sondes et de catalyse TFA au sein des formulations. Les formulations suivantes combinent trois objectifs :

— Diminution du bruit de fond dû à l'absorbance des molécules DMACA en diminuant la quantité de molécules sondes. La figure IV.12 montre des xérogels quasi incolores à t_0.

— Séchage plus homogène au sein des monolithes *via* une géométrie de 800 µm d'épaisseur.

— Mise en place de formulation TEOS pour comparer ses propriétés mécaniques à celles d'une formulation TMOS (Tableau IV.7).

Tab. IV.7 – **Ratio molaire des formulation D-91-TMOS et D-92-TEO**S (* Précurseur Si : TMOS ou TEOS selon la formulation

Formulation	D-91-TMOS	D-92-TEOS
Précurseur Si*	1	1
MeOH	5	5
DMACA	0,01	0,01
n-butyl	0,03	0,03
TFA	0,5	0,5
H_2O	4	4

La gélification de la formulation TEOS est plus longue que celle de la formulation TMOS. Comme montré au chapitre II, cette différence cinétique induit une porosité plus faible des xérogels TEOS. Il est donc attendu que la détection soit retardée dans le cas des xérogels TEOS. Le taux de perte mécanique des monolithes TMOS à 800 µm contenant une faible concentration de DMACA est très inférieur à celui des précédentes formulations TMOS. Le taux de perte mécanique de la formulation TEOS est légèrement inférieur.

Trois xérogels, un de chacune des formulations précédentes, sont exposés à une solution d'indole aqueuse à 10^{-3} mol.L^{-1} selon le protocole présenté page 169, afin de vérifier la répétabilité, qui est confirmée. La figure IV.12 présente les résultats des formulations TMOS (Figure IV.12-a) et TEOS (Figure IV.12-b).

— Après 48 h, aucun des monolithes ne présente de bande d'absorbance à la longueur d'onde du chlorure d'azafulvénium.
— En revanche, une inflexion des courbes rouges à 48 h est visible à la longueur d'onde d'absorbance du composé II. Cela indiquerait que l'indole est en excès par rapport aux molécules DMACA protonées.
— L'intensité de la bande d'absorbance à la longueur d'onde de la forme moléculaire du DMACA augmente au cours du temps. De plus en plus de molécules DMACA sont sous forme neutre.
— L'intensité d'une bande d'aborbance entre 260 nm et 280 nm augmente également. Ce domaine d'absorbance correspond aux longueurs d'onde caractéristiques de l'indole et de la forme protonée du DMACA. Or la quantité de DMACA est constante

et le pic à 383 nm montre qu'au fil du temps, les molécules DMACA passent sous forme neutre, la bande d'absorbance aux environs de 270 nm correspond donc à l'indole piégé dans le xérogel.

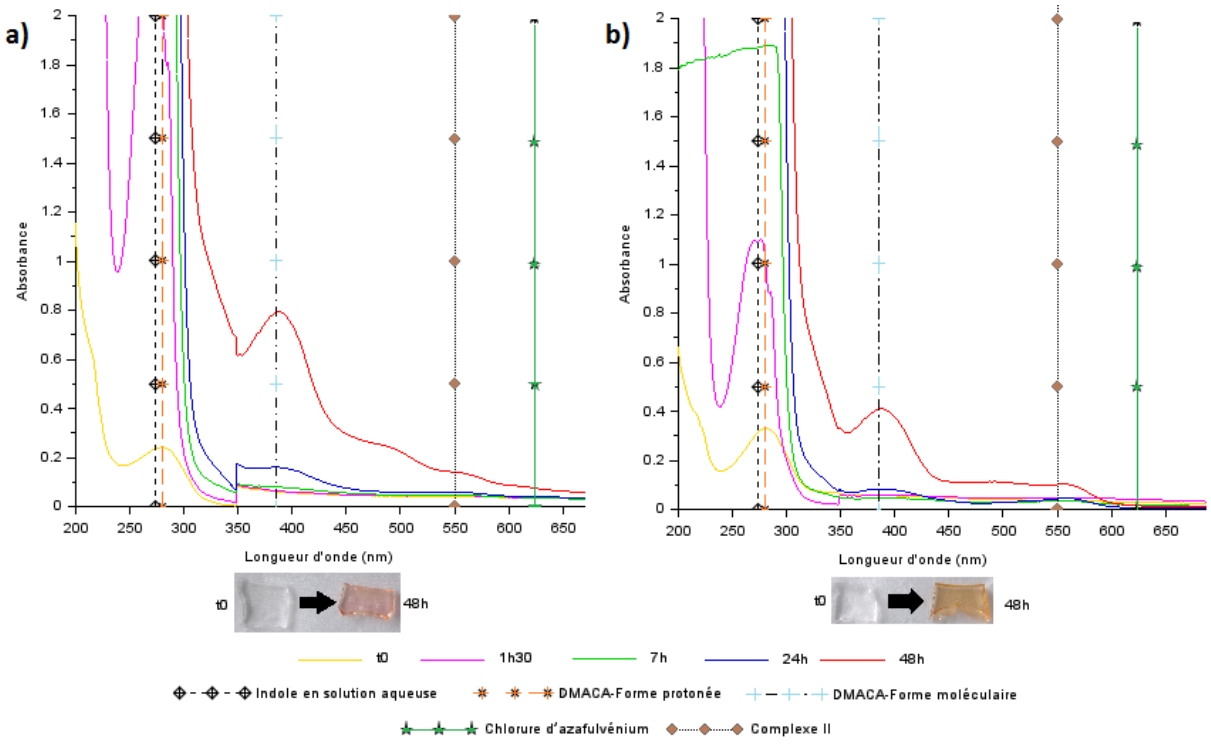


Fig. IV.12 – **Spectres d'absorbance de monolithes de formulations D-91-TMOS (a) et D-92-TEOS (b)**, au cours de leur exposition à une solution d'indole. L'intensité des pics est plus faible dans le cas des xérogels TEOS, mais le comportement des deux formulations est similaire. Le chlorure d'azafulvénium n'est pas formé, l'indole n'est donc pas détectable *via* la réaction-sonde ciblée. En revanche l'indole est détecté directement sans sonde à sa longueur d'onde d'absorbance.

La catalyse de la réaction indole-DMACA par le TFA s'est avérée insuffisante. Pour poursuivre, l'une des pistes pour combiner détection de l'indole *via* une réaction sonde cible et détection à plusieurs capteurs, serait de substituer l'acide chlorhydrique par l'**acide paratoluènesulfonique (APTS)**. En effet, cet **acide organique fort** possède un pKa de -6,5 proche de celui d'HCl et une **pression de vapeur saturante plus faible** 0,1 mbar à 20 °C.

Par ailleurs, il a été montré qu'il était possible de détecter directement l'indole *via* un sol-gel sans molécule sonde. La **détection sans molécule sonde** est particulièrement intéressante car elle permet l'usage de **formulations plus simples** et laisse espérer ici **une détection plus précoce**.

IV.3 Détection sans sonde de COV endogènes

La détection en transduction directe, c'est-à-dire sans l'emploi d'une réaction sonde cible permet de s'affranchir des contraintes liées aux molécules sondes (environnement, stabilité, réactivité).

Ainsi, elle ne nécessite pas la mise au point de réaction sonde-cible et leur incorporation dans des xérogels. Une même formulation peut cibler plusieurs COV aux propriétés spectrales différentes et spécifiques. Au besoin, la modulation du précurseur fonctionnalisé permet d'optimiser le pH équivalent afin de favoriser l'état d'une molécule au sein des pores.

Par ailleurs, la présence de molécules sondes posait le problème récurrent de l'accessibilité des COV aux molécules sondes, ce qui se traduisait en terme de rapport signal sur bruit par un rapport {molécule ayant réagi} sur {molécule à l'état initial} très souvent défavorable à la détection. Ce problème ne se posant pas en transduction directe, une meilleure sensibilité est espérée.

Deux types de COV ont été étudiés par transduction optique directe (absorbance ou fluorescence) : les COV endogènes et les COV exogènes.

Les premiers sont naturellement émis par les bactéries, certains parmi eux sont des marqueurs quasi spécifiques. En revanche ces COV présentent souvent des propriétés optiques qui rendent l'instrumentation (spectroscopie d'absorbance ou de fluorescence) indispensable.

La seconde catégorie de COV regroupe les COV dit exogènes. Ces COV exogènes sont, eux, émis par dégradation d'un substrat enzymatique. Il est possible de sélectionner le substrat enzymatique afin que sa dégradation libère un COV aux propriétés optiques intéressantes.

IV.3.1 Rappel sur la détection avec sonde spécifique de l'indole

Le DMACA s'est révélé une sonde complexe à mettre en œuvre pour une application multi-capteurs. En effet, la présence d'autres capteurs, à proximité de celui dopé DMACA, impose de substituer HCl par un autre acide. Ce changement entraine une faible stabilité du capteur DMACA, les molécules sondes évoluant vers leur forme neutre très rapidement. Cette diminution de la quantité de molécules DMACA protonées entraine à son tour une baisse de la réactivité du capteur ainsi qu'un bruit de fond important.

La détection sans sonde apparait alors comme une perspective puisqu'elle permet de s'affranchir des contraintes liées à ces réactions spécifiques. Comme illustré figure IV.13 la détection de l'indole sans sonde a donc été étudiée selon deux modes de transduction : absorbance et fluorescence.

Fig. IV.13 – **La détection de l'indole sans sonde peut être effectuée selon deux modes de transduction : Absorbance et Fluorescence**

Les deux modes de transduction ont été mis en place d'abord *via* l'utilisation de milieux artificiels aqueux puis dans des milieux de complexité croissante.

IV.3.2 Détection de l'indole en absorbance sans sonde

IV.3.2.1 Détection en milieux aqueux : sélection de la formulation de xérogels la plus performante

En solution aqueuse l'indole absorbe à 272 nm. Il est donc possible de le détecter en le piégeant dans un monolithe sans sonde (cf. p.127). Trois formulations de xérogels, TMOS/ABTES$_{1/0,03}$, TMOS/ABTES$_{1/0,15}$ et TMOS/Nbutyl$_{1/0,03}$, sont ainsi testées, selon le protocole d'exposition en annexe p.169, vis à vis de solutions aqueuses d'indole de concentration allant de 5.10^{-4} mol.L^{-1} (soit environ 200 ppb en phase gazeuse) à 10^{-2} mol.L^{-1} (soit environ 4 ppm en phase gazeuse) (Tableau IV.8). Le premier critère est que ces xérogels n'absorbent intrinsèquement pas au-delà de 250 nm. Les temps de détection sont particulièrement intéressants. Ainsi, pour les trois formulations, 200 ppb sont détectés en moins de 24 h. La figure IV.14 illustre cette détection. Les temps de détection retenus correspondent au spectre où les bandes d'absorbance sont pleinement attribuables à l'indole, qui peut être identifié. Dans les faits, la présence du COV commence à influencer le spectre du matériau pour des durées d'exposition plus courtes. Il apparait que la formulation TMOS/ABTES$_{1/0,03}$ est la plus favorable.

A titre comparatif, des formulations TEOS ont également été testées. La détection s'effectue en plus de 24 h. Enfin, une exposition à une solution à 10^{-4} mol.L^{-1} a également été effectuée, les temps de détection sont aussi supérieurs à 24 h pour les trois formulations. Ces résultats ne sont pas présents dans le tableau.

	10^{-2} mol.L^{-1} 4 ppm	5.10^{-3} mol.L^{-1} 2 ppm	10^{-3} mol.L^{-1} 400 ppb	5.10^{-4} mol.L^{-1} 200 ppb
TMOS/ABTES$_{1/0,03}$	6 h	6 h	16 h	18 h
TMOS/ABTES$_{1/0,15}$	7 h	$<$ 16h	20 h	20 h
TMOS/Nbutyl$_{1/0,03}$	6 h	7 h	16 h	20 h

Tab. IV.8 – **Limite de détection de l'indole, pour différentes formulations de xérogels**. Les concentrations sont données pour la solution aqueuse d'indole, tandis que le ppm et ppb correspondent à la phase gazeuse.(annexe)

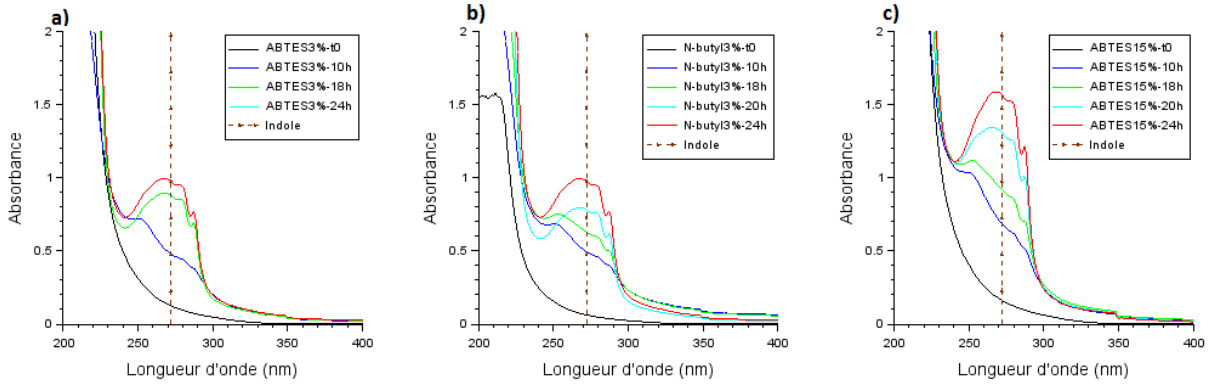


Fig. IV.14 – **Spectres d'absorbance de xérogels** exposés à une solution aqueuse à 5.10^{-4} mol.L^{-1} en indole, soit environ 200 ppb en phase gazeuse. **a)** Xérogel TMOS/ABTES$_{1/0,03}$: détection 18 h ; **b)** Xérogel TMOS/Nbutyl$_{1/0,03}$: détection 20 h ; **c)** Xérogel TMOS/ABTES$_{1/0,15}$: détection 20 h.

Une détection de 200 ppb en moins de 24 h est très intéressante pour la suite. Cela permet d'envisager de tester cette détection sur des matrices de culture réelles.

Les xérogels TMOS/ABTES$_{1/0,03}$ ayant donné les temps de détection les plus courts c'est cette formulation qui est retenue pour les expérimentations en milieux complexes de détection de l'indole sans sonde.

IV.3.2.2 Détection de l'indole microbien en milieux microbiologiques

La détection de *E.coli* a été au effectuée sein de trois milieux de culture bactériens de complexité croissante :

— Gélose TSA [2] (boîte de Petri)

— Eau pépetonnée tamponnée (EPT)

— Matrice alimentaire (Hachis Parmentier Bio Carrefour)

Pour chacun des trois milieux l'expérimentation de référence est la détection de *E.coli*,. En parallèle deux types de témoins ont été mis en place : milieu seul pour caractériser le bruit de fond apporté par la matrice d'une part et milieu contenant de l'indole chimique

2. Gélose Trypto-caséine soja (TSA) est un milieu nutritif universel

d'autre part afin d'évaluer l'impact de la matrice sur le passage de l'indole en phase gazeuse.

Pour les trois catégories de milieux distincts étudiés, l'ensemencement bactérien est effectué à partir de suspensions bactériennes préparées selon le protocole de microbiologie décrit en annexe page 183.

Détection en milieu gélosé.

Après préparation des milieux (annexe p. 185), les xérogels de formulation TMOS/ABTES$_{1/0,03}$ sont déposés au fond de toutes les boites qui sont incubées à 37°C. L'absorbance des xérogels est contrôlée régulièrement au fil du temps pendant 48 h.

Le tableau IV.9 présente les résultats [3].

	E.coli	**Indole**	**Témoin**
	10^3 ufc.mL^{-1}	10^{-3}mol.L^{-1}	
Présence de bactéries sur la gélose			
24 h	☑	☒	☒
Absorbance aux alentours de λ_{max}^{indole} = 270 nm			
24 h	☑	☑	☒
48 h	☑	☑	☒

☑ / ☒ : Présence / Absence respectivement de bactéries sur la gélose ou d'une bande d'absorbance aux alentours de 270 nm en spectroscopie d'absorbance

Tab. IV.9 – **Détection de l'indole en absorbance sans sonde sur gélose.** Les xérogels permettent la détection de l'indole chimique et de *E.coli*

La détection sur gélose s'avère possible. Cependant, le temps de détection de l'indole *via* le xérogel n'est pas intéressant car la croissance des bactéries permet déjà de les visualiser à l'œil nu. Un opérateur averti est capable d'émettre directement un premier diagnostic d'identification, sans avoir recourt à un équipement spécifique.

Détection dans l'EPT

L'EPT est un milieu de culture courant en microbiologie. C'est en effet un milieu nutritif non sélectif, utilisé comme milieu de pré-enrichissement avant un enrichissement sélectif. Bien que les compositions exactes diffèrent d'un fabricant à l'autre, la poudre, à partir de laquelle sont préparées les solutions, comporte des péptones, du chlorure de

3. La mesure est ici purement qualitative, il s'agit de valider ou non ce mode de détection. Dans un second temps une mesure quantitative pourra être envisagée. Cette nouvelle approche nécessiterait de s'assurer de l'homogénéité structurale des xérogels utilisés lors d'une même exposition.

sodium, et sont, le plus souvent complétées de tampon phosphate. Hydratée, la poudre permet l'obtention d'une solution aqueuse jaune de pH 7,2 ± 0,2.

Cette couleur jaune ne permet pas la détection en absorbance sans sonde de l'indole dans la phase liquide. En analysant la phase gazeuse, au-dessus des cultures, notre capteur devrait permettre de s'affranchir de l'absorbance intrinsèque du liquide pour la détection de l'indole.

Après préparation des milieux selon le protocole détaillé en annexe page 185, les xérogels sont introduits dans les flacons. L'ensemble des tubes est placé dans un incubateur à 37°C sous agitation. En parallèle, des comptages sur boîtes, selon la norme ISO 7218, ont été effectués pour contrôler la charge bactérienne. [114]

Le tableau IV.10 regroupe les différents résultats. A 24 h d'exposition, seuls les xérogels exposés à la solution à 10^{-2}mol.L^{-1} sont positifs, les témoins eux sont négatifs. Dans ce cas il est donc possible d'attribuer les pics à l'indole.

Par contre, tous les xérogels possèdent une bande d'absorbance aux alentours de 270 nm, après 48 h d'exposition, tandis que les contrôles par étalage sur boites attestent que des bactéries ne sont présentes que dans les milieux inoculés. Après 48 h, l'EPT relargue donc naturellement des composés absorbant à des longueurs d'ondes proches de celle de l'indole. Il n'est donc pas possible de déterminer après 48 h d'exposition si les pics visibles sont dus à la présence d'indole ou simplement au milieu. Il s'agit très probablement d'une double contribution.

	E.coli	**Indole**		**Témoin**
	10^3 ufc.mL^{-1}	10^{-3}mol.L^{-1}	10^{-2}mol.L^{-1}	
Présence de bactéries après étalement sur la gélose				
24 h	☑	☒	☒	☒
Absorbance aux alentours de λ_{max}^{indole} = 270 nm				
24 h	☒	☒	☑	☒
48 h	☑	☑	☑	☑

☑ / ☒ : Présence / Absence respectivement de bactéries sur la gélose ou d'une bande d'absorbance aux alentours de 270 nm en spectroscopie d'absorbance

Tab. IV.10 – **Détection de l'indole en absorbance dans de l'EPT.** Les xérogels ont été exposés à des échantillons témoins, de l'indole chimique et *E.coli*. La solution d'indole chimique la plus concentrée est détectée à 24 h. A 48 h le milieu relargue intrinsèquement des composés ; ce qui empêche la détection de l'indole chimique ou bactérien.

Le signal spécifique de l'indole est visible à 24 h mais ne l'est plus après un temps d'accumulation plus long. Ce phénomène laisse présager une détection parasité liée à la matrice.

L'EPT est un milieu riche en peptone et en nutriment. Il est possible qu'une partie passe en phase gazeuse. Dans ce milieu **la détection est possible si la cinétique de**

capture de l'indole est plus rapide que le passage de la fraction volatile du milieu en phase gazeuse.

Détection de l'indole dans une matrice alimentaire

Les matrices alimentaires comme la plupart des autres matrices biologiques (selles, sang) sont troubles et absorbantes. La détection en phase liquide n'est donc pas possible. L'analyse de la phase gazeuse, par contre, contourne cette barrière et ouvre de nouvelles possibilités de détection.

La matrice alimentaire étudiée ici est un hachis Parmentier Bio Carrefour supposé stérile. La partie viande du hachis, *a priori* la plus contaminée, a particulièrement été ciblée lors du prélèvement. Le protocole de préparation des échantillons est détaillé en annexe page 186.

Le comptage sur boite de Pétri, effectué sur le milieu encore non inoculé, montre la croissance de bactéries. Les tests sur milieux chromogéniques révèlent la présence de coliformes dans la matrice, qui s'avère donc être non stérile. Il sera nécessaire d'en tenir compte pour interpréter les résultats.

Le tableau IV.11 présente les résultats qui sont similaires à ceux obtenus dans l'EPT seule. A 24 h seuls les xérogels exposés à une solution de 10^{-2}mol.L^{-1} d'indole sont positifs. A 48 h, l'ensemble des xérogels est positif. Les comptages sur boites révèlent la présence homogène de bactéries ($\sim 4.10^3$ ucf.mL^{-1}) dans l'ensemble des tests. Il est à noter que la contamination n'engendre pas de réponse particulière.

	E.coli	**Indole**		**Témoin**
	10^3 ufc.mL^{-1}	10^{-3}mol.L^{-1}	10^{-2}mol.L^{-1}	
Présence de bactéries après étalement sur la gélose				
24 h	☑	☑	☑	☑
Absorbance aux alentours de λ_{max}^{indole} = 270 nm				
24 h	☒	☒	☑	☒
48 h	☑	☑	☑	☑

☑ / ☒ : Présence / Absence respectivement de bactéries sur la gélose ou d'une bande d'absorbance aux alentours de 270 nm en spectroscopie d'absorbance

Tab. IV.11 – **Détection de l'indole en absorbance dans du hachis Parmentier.** Les résultats à 24 h montrent une distinction entre les xérogels exposés à la plus forte concentration en indole et ceux exposés aux autres conditions. A 48 h l'ensemble des xérogels sont positifs.

Contrairement à l'hypothèse de départ, la matrice alimentaire s'avère ne pas être stérile. Cette contamination peut avoir deux origines. Lors de la préparation de l'expérimentation, la matrice peut avoir été contaminée. L'échantillon commercial peut ne pas

être stérile. En effet, la réglementation agroalimentaire n'impose pas une stérilité parfaite mais des seuils relatifs à différentes espèces bactériennes.

Le travail avec des matrices alimentaires réelles, potentiellement non stériles, pose un problème d'objectivité quant à la charge bactérienne en présence et la répétabilité d'une expérimentation à l'autre.

IV.3.2.3 Conclusion sur la détection en absorbance sans sonde de l'indole

La détection d'indole à partir d'un milieu aqueux a pu être réalisée à partir de xérogels n'absorbant pas au-delà de 230 nm (p. 131). L'hypothèse était que la détection en phase gazeuse permet de nous affranchir de la coloration de milieux liquides et donc des espèces absorbantes qui les composent. Or, l'ensemble des xérogels en présence d'EPT (avec ou sans matrice alimentaire) voit son absorbance augmenter entre 255 et 275 nm. Dans cette gamme de longueurs d'onde, le pic peut aussi bien être lié à la présence d'indole que d'EPT. En effet, il est probable qu'une fraction des acides aminés de la solution passe en phase gazeuse, bien que ceux-ci soient très solubles dans le milieu aqueux et peu volatils. Certains comme la lysine ou le tryptophane possèdent une couleur allant de jaune claire à marron, ils sont, parmi, les acides aminés des interférents probables, absorbant à la longueur d'onde ciblée pour détecter l'indole. La figure IV.15 présente le spectre d'absorbance d'un xérogel exposé 48 h à l'EPT. Dé-corréler les pics est un exercice trop opérateur-dépendant pour être pertinent ici. La méthode de détection de l'indole en absorbance sans sonde n'est donc pas utilisable dans l'EPT. Ce milieu étant l'un des plus courants en microbiologie industrielle, le champ d'application et la possibilité de developpement de ce mode de transduction sont limités. D'autant qu'il est fort probable que le même phénomène soit observé avec d'autres milieux nutritifs.

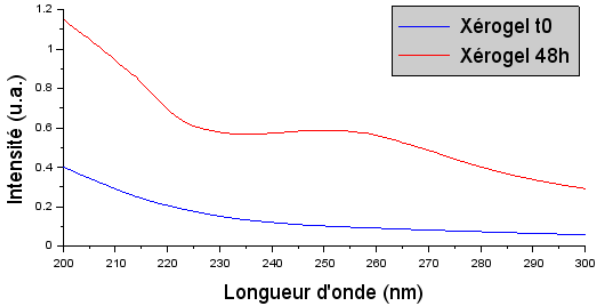


Fig. IV.15 – **Exposition d'un xérogel à de l'EPT seul.** Après 48 h d'exposition une bande d'absorbance est apparue entre 250 et 270 nm

Deux axes de développement sont donc envisageables :

— détecter l'indole selon un mode de transduction autre que l'absorbance sans sonde
— détecter en absorbance sans sonde, des COV qui absorbent à des longueurs d'ondes nettement supérieures à celles des composés du milieu nutritif.

La détection de l'indole en absorbance sans sonde nécessiterait de s'extraire du bruit de fond produit par la matrice en augmentant la vitesse d'accumulation de l'indole dans le capteur, sans toutefois augmenter celle de la fraction issue de la matrice.

IV.3.3 Détection de l'indole en fluorescence sans sonde

En parallèle de la détection en absorbance, la détection en fluorescence a également été étudiée. Cette voie de transduction ouvre généralement la possibilité d'accroitre la sensibilité.

Les xérogels utilisés pour la détection par fluorescence sont préparés selon le protocole p. 167. Contrairement aux lots de xérogels employés en absorbance, il s'agit de xérogels TEOS/EtOH/H_2O/ABTES de ratio molaire 1/3,5/11/0,12, synthétisés en salle blanche dans des cuves polystyrènes (cf. p. 182). Bien que cette formulation permette un faible taux de perte, le nombre est limité par la production de xérogels. Le nombre d'expériences conduites ne suffit donc pas pour qu'elles soient statistiquement déterminantes mais elles permettent d'évaluer l'intérêt de développer cette voie de transduction.

L'indole émet à 355 nm pour une excitation à 287 mn en milieu liquide. [115] Dans les milieux nutritifs et alimentaires, des COV autres que l'indole sont susceptibles d'être relargués. C'est donc l'aspect cinétique du relargage et de la capture de l'indole qui autorisera ou non la détection.

IV.3.3.1 Détection de l'indole en fluorescence sans sonde dans différents milieux

Les expositions se font selon le protocole d'exposition de l'annexe page 169 dans des flacons de 15 mL. L'expérimentation de référence est la détection de E.coli dans l'EPT. La charge bactérienne est volontairement choisie très élevée pour favoriser la cinétique de capture de l'indole. En parallèle deux témoins sont mis en place : une exposition à l'indole en solution aqueuse ainsi qu'une exposition à l'EPT.

a) Indole chimique en solution aqueuse à 10^{-3} mol.L^{-1} ($\sim$ 400 ppb en phase gazeuse)
b) EPT
c) *E.coli* dans EPT (10^5 ufc.mL^{-1})

Comme les matrices du chapitre III l'ont préalablement montré, la fluorescence de l'indole, au sein d'un xérogel, est décalée par rapport à sa fluorescence au sein d'un liquide.

La première étape de l'analyse est donc de déterminer le couple λ_{ex}^{indole}(sol-gel)-λ_{em}^{indole}(sol-gel). Pour cela, après une heure d'exposition à la solution aqueuse d'indole, un spectre d'excitation à λ_{ex}^{indole}(liquide) est effectué pour estimer λ_{em}^{indole}(sol-gel). Le maximum d'émission est alors atteint pour 345 nm. Un spectre d'émission est effectué à 345 nm pour

cibler plus précisément λ_{ex}^{indole}(sol-gel), qui correspond à 284 nm. Un spectre d'excitation à 284 nm permet de contrôler et d'ajuster au besoin la valeur de $\lambda_{em}^{indole} = 345$ nm.

IV.3.3.2 Résultats des expositions

Au préalable de chaque exposition, les xérogels sont exposés une nuit à des vapeurs d'eau afin de contrôler la fluorescence intrinsèque des monolithes [4]. Malgré des variations de faible intensité, les xérogels restent utilisables.

La figure IV.16 présente les résultats pour des expositions dans les trois milieux.

La détection de l'indole issue d'une solution aqueuse (figure IV.16-a) est possible dès une heure d'exposition. Un pic est visible aux environs de 350 nm ; le signal sature rapidement par la suite. A titre de comparaison, la détection de l'indole en absorbance sans sonde est de l'ordre de 16 h, en absorbance avec sonde spécifique, cela dépend de la nature du catalyseur : de quelques minutes pour une catalyse HCl à plusieurs heures pour une catalyse TFA.

L'exposition du xérogel à l'EPT seule, (figure IV.16-b), confirme l'émission naturelle de COV non ciblés à partir du milieu nutritif.

Le troisième xérogel a été exposé à de l'EPT inoculé avec *E.coli* (figure IV.16-c). Après une heure d'exposition, l'intensité globale a augmenté. A 6 h d'exposition, un pic semble se détacher à 350 nm. Les spectres suivants montrent que le pic est par la suite noyé dans le signal global.

La détection de l'indole, issue d'une solution aqueuse, nous permet de déterminer la longueur d'onde à laquelle l'indole émet au sein d'un xérogel pour une émission à 284 nm. En effet, le xérogel ayant préalablement été soumis à de la vapeur d'eau pendant une nuit, la bande d'absorbance à 345 nm, ne peut être attribuée uniquement à l'indole.

La présence de la bande d'absorbance 345 nm visible après 6 h d'exposition à une culture d'*E.coli* dans de l'EPT, noyé au fil du temps dans le signal global, montre que la possibilité de détecter l'indole dans l'EPT est une question de compétition entre la capture du COV et le bruit de fond induit par l'EPT. Avant un laps de temps minimal, la croissance bactérienne n'a pas atteint un stade où la production d'indole est détectable. Après une incubation trop longue, l'indole n'est plus différentiable des autres COV du milieux.

Le **monitoring en continu**, avec une instrumentation plus lourde, apparait donc comme la seule **méthode viable pour détecter l'indole *via* des xérogels en fluorescence.**

4. Un xérogel sec est peu fluorescent, l'eau révèle les éventuels polluants

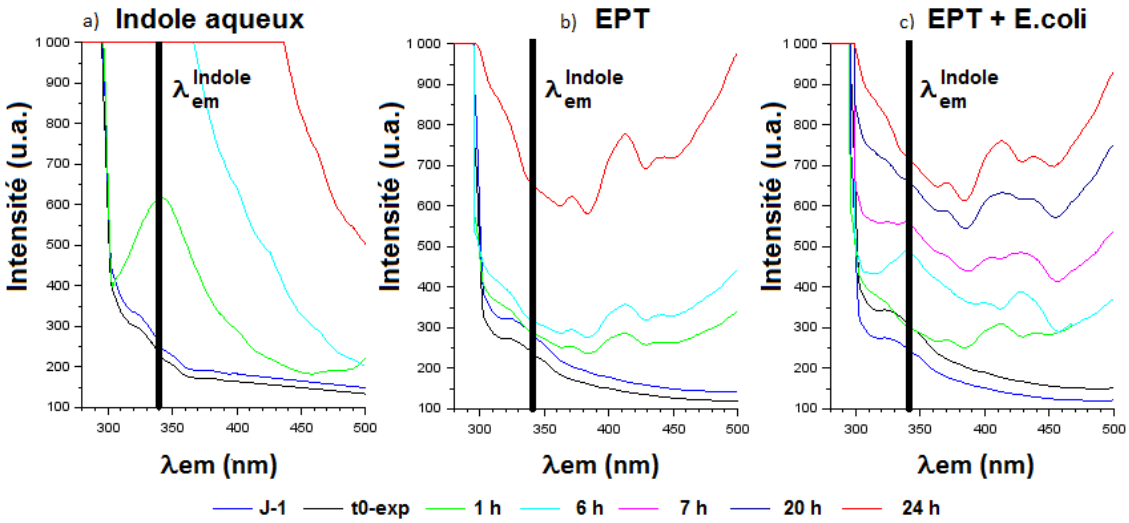


Fig. IV.16 – **Spectre de fluorescence d'expositions de xérogels TEOS à trois milieux pour une excitation à 284 nm**. La large bande d'absorbance allant de 280 nm à 300 nm présente sur chaque graphique correspond à la lumière d'excitation diffusée au sein du matériau.

IV.4 Détection sans sonde de COV exogènes

IV.4.1 Les voies enzymatiques spécifiques mises en place

L'emploi d'un mode de transduction sans sonde permet de s'affranchir du développement de nouveaux capteurs pour chaque pathogène cible. Cependant, comme le montre l'exemple de l'indole, il n'est pas toujours aisé de détecter les COV endogènes des bactéries. En effet, ces derniers présentent des propriétés optiques ou chimiques qui rendent difficile la distinction entre COV bactériens et COV issus du milieu de culture souvent complexe.

Les COV exogènes présentent une alternative intéressante. Ils sont émis lors de la dégradation de substrats enzymatiques. Choisir le substrat enzymatique permet de cibler, d'une part, une activité enzymatique particulière et, d'autre part, un COV exogène ayant des propriétés optiques facilitant la détection.

La spécificité de plusieurs activités enzymatiques a été étudiée dans plusieurs milieux (Figure IV.17). Il s'agit de déterminer les limites de la spécificité et de déterminer la combinaison de capteurs la plus pertinente pour obtenir un début d'identification.

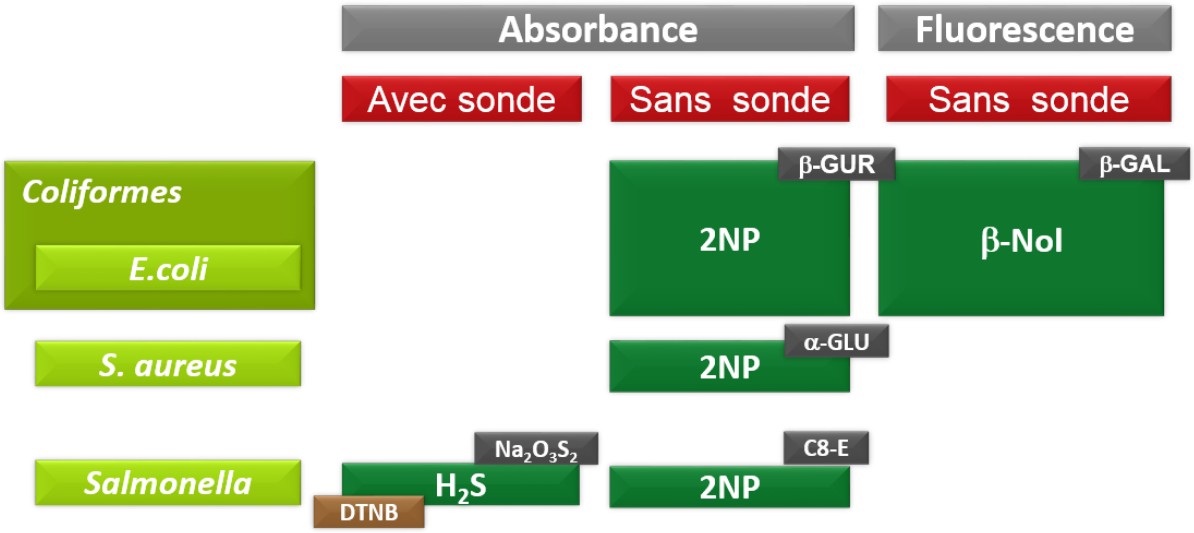


Fig. IV.17 – **Modes de détection associés à trois bactéries courantes *E.coli*, *S.aureus* et *Salmonella*.** Les cadres verts indiquent les COV exogènes ciblés tandis que les cadres gris présentent les voies enzymatiques utilisées. β**-GUR** : β-glucuronidase, α**-GLU** :α-glucosidase, **C8-E** : C8-estérase et β**-GAL** : β-galactosidase. Ce tableau présente aussi le cas particulier de l'H_2S induit par ajout $Na_2O_3S_2$ pour stimuler l'activité thiosulfate réductase. Il ne s'agit donc pas, à proprement parler, d'un COV exogène.

Au cours de ces travaux deux COV exogènes ont été étudiés : le 2-nitrophénol et le β-naphtol (Figures IV.18). Le premier est détecté en absorbance sans sonde à 415 nm et le second en fluorescence à 345 nm pour une excitation à 284 nm. Le tableau IV.12 présente les différentes voies enzymatiques qui ont été testées dans cette étude.

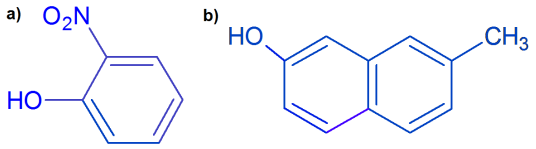
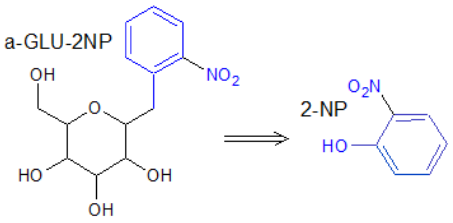
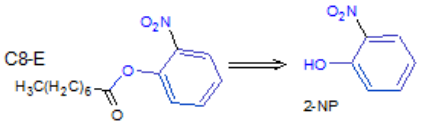
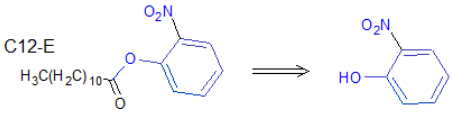
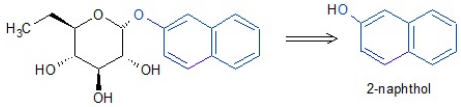
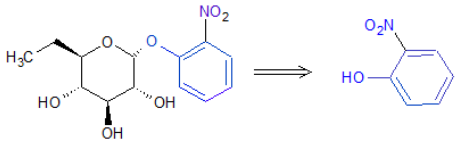
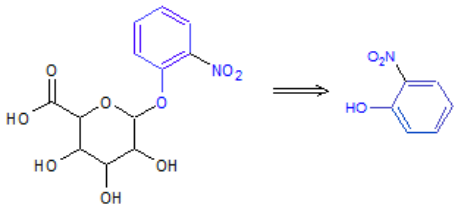


Fig. IV.18 – a) 2-nitrophénol (**2-NP**)b) β-naphtol (β-**Nol**)

Les deux activités glycosidases sont généralement associées respectivement à *E.coli* et *S.aureus* tandis que l'activité estérase correspondrait à *Salmonella*. Il a donc été nécessaire de caractériser cette spécificité (cf. p.142). Si elle est réelle, la détection du 2-nitrophénol est véritablement très intéressante : d'une part l'usage de substrat enzymatique spécifique permet l'identification, d'autre part la limite de détection du 2-nitrophénol (28 ppb) laisse présager une détection précoce. [59]

Le 2-nitrophénol COV cible permet de détecter plusieurs activités enzymatiques et donc d'identifier potentiellement trois pathogènes. Cependant, le ciblage d'un COV unique rend impossible une détection au sein d'un échantillon doublement contaminé où deux activités enzymatiques seraient présentes. Le plus probable étant que *E.coli* soit en présence de l'une ou l'autre des deux autres bactéries. Nous nous sommes donc intéressés à des nouveaux couples activité enzymatique - COV cible pour détecter *E.coli*. Cette bactérie est un *coliforme*. De fait, elle possède l'activité enzymatique β-galactosidase. Cette activité peut être mise en évidence *via* la détection 2-naphtol en fluorescence (cf. p.147).

Activité enzymatique	Substrat enzymatique			Page
	Abréviation	Réaction enzymatique	CAS	
α-GLU α-glucosidase	αGLU-2-NP	2-nitrophényl-α-glucopyranoside 	56193-44-3	142
C8-E C8-Estérase	C8-E-2NP	2-nitrophényl caprylate 	104809-25-8	146
C12-E C12-Estérase	C12-E-2NP	2-nitrophényl laurate 	2639-52-3	141
β-GAL β-Galactosidase	β-GAL-2-Nol	2-Naphthyl-β-D-galactopyranoside hydrate 	312693-81-5	147
	β-GAL-2-NP	2-Nitrophenyl β-D-galactopyranoside 	369-07-3	147
β-GUR β-Glucuronidase	β-GUR-2NP	2-Nitrophenyl 2-Nitrophenyl-β-D-glucuronide 	137629-36-8	147

Tab. IV.12 – **Activités enzymatiques étudiées et leurs substrats de mise en œuvre**

IV.4.2 Impact d'une matrice alimentaire grasse sur la détection de COV : exemple de la mousse au chocolat

Une mousse au chocolat est un milieu triphasique constitué d'une phase aqueuse, d'une phase grasse et d'air. Au cours la préparation, le mélange étant homogénéisé, seules les phases aqueuse et grasse sont encore présentes lors de l'expérimentation. Il s'agit d'une émulsion de gouttelettes de beurre de cacao dans de l'eau. L'albumine y joue le rôle d'émulsifiant en stabilisant le mélange de matière grasse et d'eau en formant des micelles. Il est attendu que le 2-NP ait des affinités avec la phase lipophile, diminuant ainsi sa constante de Henry et son émission en phase gazeuse. Par ailleurs, il s'agit d'une phase riche contenant de nombreuses sources de carbone, entrainant une concurrence possible entre le milieu et le substrat enzymatique ajouté en vue de la détection d'un COV particulier. Les expérimentations ci-après illustrent ces deux phénomènes.

Cette première expérience compare la détection du 2-NP chimique en milieu aqueux, dans de l'EPT et dans un mélange EPT + mousse au chocolat (Figure IV.19).

Le passage de l'eau à l'EPT n'a que peu d'impact sur la détection du 2-NP. L'introduction de mousse en chocolat dans le milieu a par contre un impact fort sur la détection du COV.

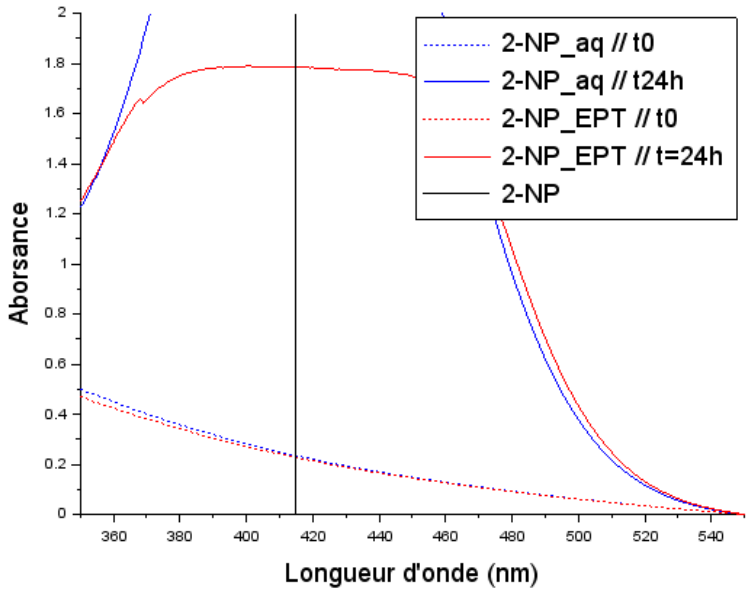


Fig. IV.19 – **Détection du 2-NP dans des matrices de complexité croissante.** *Paramètres expérimentaux : Formulation* $ABTES_{12\%}$ - $\frac{m_{choc}}{V^{tot}}$*=10 –* V^{L}*=7 –* V^{tot}*=15 - [2-NP]=* 1.10^{-3} $mol.L^{-1}$ $\Rightarrow$ *200* ppb^{G}

La seconde expérimentation illustre la concurrence entre les sources de carbone disponibles. Dans cet exemple, *E.coli* est détectée *via* l'activité enzymatique C12-estérase à partir du substrat 2-Nitrophenyl laurate.

Les résultats montrent une extinction totale de la détection en milieu chocolaté. Deux explications complémentaires peuvent être proposées. D'une part, il est possible que le substrat ai été peu ou pas dégradé du fait d'importantes sources de carbones dans le milieu. D'autre part, il est possible que la quantité en phase gazeuse soit extrêmement faible du fait de l'affinité du 2-NP pour la matière grasse de la matrice.

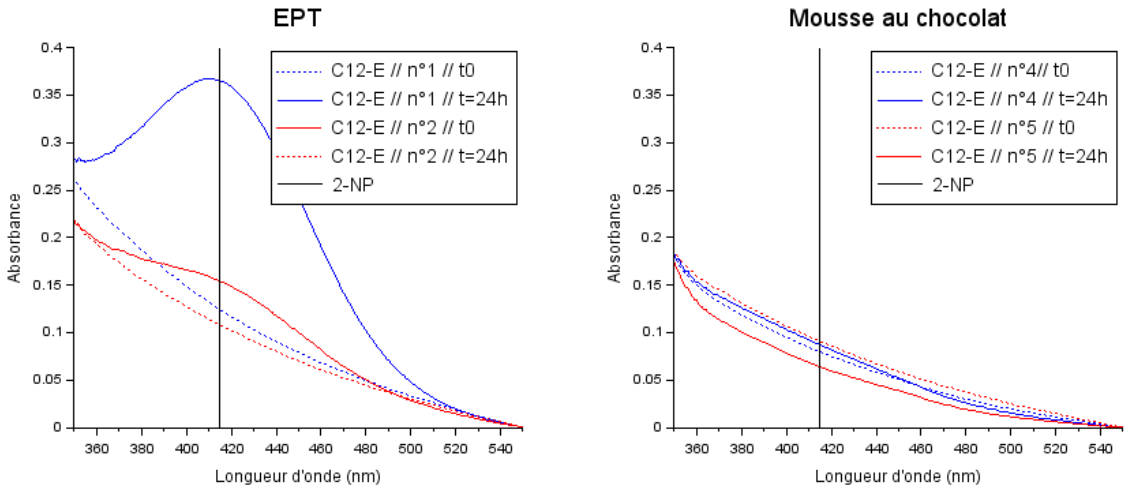


Fig. IV.20 – **Détection du 2-NP issu de la dégradation du substrat 2-Nitrophenyl laurate (C12-E) par *E.coli***

Paramètres expérimentaux : Formulation $ABTES_{12\%}$ - $\frac{m_{choc}}{V^{tot}}$ *=10 –* V^L *=7 –* V^{tot} *=15 -*

[C12-E-oNP]= 1,1.10^{-3} *mol.L*$^{-1}$ - $\frac{T_{20}}{C12-E-2NP} = 15^5 \Rightarrow 200\ ppb^G$

La détection de COV microbiens issus de cultures en matrice alimentaire peut donc être rendue complexe par la solubilité des COV dans la phase lipophile de ces matrices. De plus, dans le cas de COV exogènes, des sources de carbones issues de la matrice entrent en compétition avec le substrat. La dégradation de ce dernier est alors retardée ; ce qui entraine une augmentation des temps de détection.

IV.4.3 Détection de *Staphylococcus aureus via* l'activité enzymatique α-glucosidase

Staphylococcus aureus est capable d'hydrolyser les liaisons osidiques grâce à l'activité enzymatique α-glucosidase. Cette particularité a notamment permis l'élaboration de milieux gélosés chromogéniques ChromID SA/MRSA de bioMérieux. [116] Ces méthodes de détection de *S.aureus* mettent en jeu le clivage d'un substrat dont le précipité non soluble colore les cellules et permet l'identification des colonies. [117]

Nous avons donc ciblé l'activité α-glucosidase à l'aide du substrat 2-nitrophényl-α-glucopyranoside (Figure IV.21), pour détecter *S.aureus* de manière la plus sélective possible.

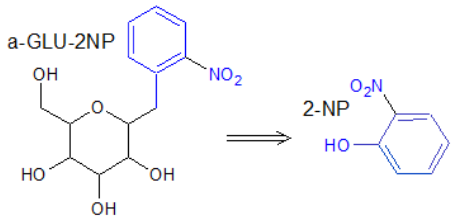


Fig. IV.21 – **Voie enzymatique 2-nitrophényl-α-D-glucopyranoside**

IV.4.3.1 Spécificité de l'activité enzymatique α-glucosidase pour la détection de *S.aureus* dans une matrice alimentaire.

La matrice alimentaire choisie ici est la mayonnaise industrielle, Lesieur « à ma façon ». Cette mayonnaise possède la particularité d'avoir, dans sa composition des œufs frais. Ces derniers sont des sources possibles de contamination à *S.aureus* et *Salmonella*.

L'expérimentation suivante compare, à quatre temps d'incubation (8 h, 16 h, 20 h et 24 h), l'activité α-glucosidase d'une gamme de souches bactériennes, comprenant en plus de *Staphylococcus aureus* (*SA75*), deux bactéries Gram positive (Gram $^+$) [6] les *Staphylococcus epidermidis* (*SE26*, *SE68*) appartenant au microbiote de la peau, ainsi que deux entérobactéries (*EC28*, et *HA54*).

Le support choisi est alors un flacon en verre de contenance 200 mL. La concentration en substrat dans le liquide est de 250 μmol.L^{-1} si l'intégralité du substrat est clivé la concentration en phase gazeuse est de l'ordre de 50 ppb [7].

Résultats expérimentaux

Le tableau IV.13 présente les résultats des expositions. La détection du 2-NP intervient d'abord pour *SA75* et *EC28* après 16 h d'exposition. A 20 h d'incubation, l'activité enzymatique est détectée chez les deux staphylocoques blancs [8] (*SE26* et *SE68*). Enfin à 24 h, *HA54* se révèle également α-glucosidase positive.

L'ensemble des souches se révèlent α-glucosidase positives à 24 h, leur distinction est donc liée à leur cinétique de détection. Celle-ci dépend de la vitesse de dégradation du substrat par les bactéries. Or les temps de génération de la gamme de bactéries testées varie d'une espèce à l'autre. Ainsi, les bactéries ayant le temps de génération les plus courts, *SA75* et *EC28*, conduisent à une détection du 2-NP plus précoce que *HA54* qui possède un temps de génération plus long.

Le clivage du substrat est donc bien dépendant de la quantité de bactéries dans le milieu. La distinction entre espèces se fait donc en reliant la libération du 2-NP à la

6. La coloration au Gram est un élément de la taxonomie bactérienne caractérisant les propriétés membranaires des individus. Les bactéries à Gram $^+$ apparaissent mauves au microscope.

7. La littérature donne 28 ppb comme limite de détection *via* une transduction par xérogel [59]

8. Les *Staphylocoques blancs* ou *epidermidis* appartiennent au microbiote de la peau et ne sont pas pathogènes.

vitesse de génération des bactéries.

L'activité α-glucosidase n'est pas suffisante pour identifier *S.aureus*. Elle est un marqueur nécessaire mais non suffisant.

	V_{Tot} = 200 mL // $V_{liquide}$ = 36 mL [α-GLU -2NP]= 250 μmol.L^{-1} $\Rightarrow$ 50 ppb$_{ideal}$// 10.^{2} ufc.mL^{-1}					
	SA75	*EC28*	*SE26*	*SE68*	*HA54*	Témoin
8 h	☒	☒	☒	☒	☒	☒
16 h	☑	☑	☒	☒	☒	☒
20 h	☑	☑	☑	☑	☒	☒
24 h	☑	☑	☑	☑	☑	☒

Tab. IV.13 – **Présence de l'activité enzymatique α-glucopyranosidase** chez un panel de cinq bactéries

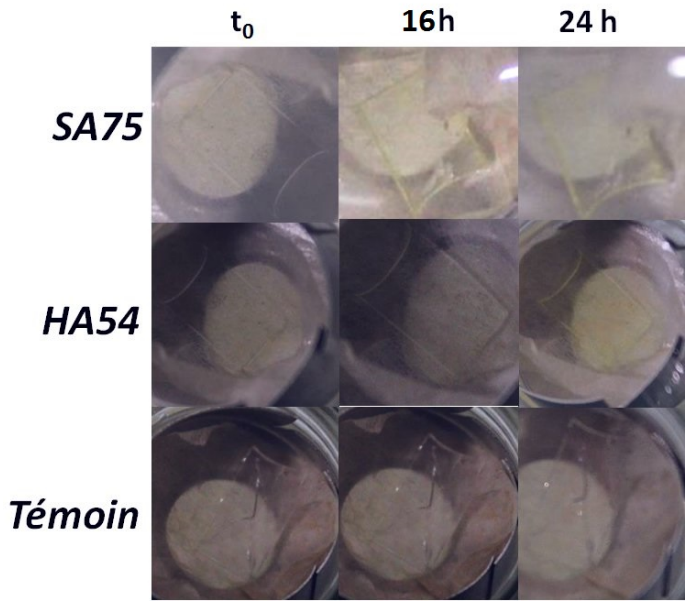


Fig. IV.22 – **Détection de l'activité α-GLU chez *SA75* 16 h e t*HA54* : 24 h.** A t_0, les xérogels sont incolores. Ils deviennent progressivement jaunes lors de la capture du 2-NP, dès 16 h d'exposition pour *SA75* et après 24 h pour *HA54*

IV.4.4 Détection de *Salmonella via* les activités enzymatiques C8-Estérase et thiosulfate réductase

Les deux activités enzymatiques, C8-Estérase et thiosulfate réductase, ont été identifiées chez *Salmonella*. Elles ont permis l'élaboration de géloses chromogènes commerciales (CHROMAgar de Becton Dickinson et RAPID' Salmonella de Bio-Rad). Il a également été montré qu'elles étaient présentes chez *E.coli*. Nous nous sommes intéressés à la présence ou l'absence de ces activités sur un panel de bactéries afin d'évaluer si ces voies apportaient un peu de sélectivité. Les tests ont été réalisés dans de la mousse au chocolat "Bonne Maman" aux œufs frais.

Résultats expérimentaux

La présence de l'activité enzymatique C8-Estérase a été testée via la libération puis la capture du 2-NP. La figure montre que l'ensemble des xérogels TMOS/ABTES$_{1/0,12}$, incolores à t_0 sont devenus jaunes dès 16 h d'incubations. L'activité thiosulfate réductase est testée via des xérogels TMOS/APTES/DTNB$_{1/0,03/0,004}$. [58] Seule *Salmonella* induit un changement de couleur du xérogel et est donc H_2S positive.

Ainsi, les résultats présentés figures IV.24 et IV.23 montrent que l'ensemble des bactéries testées possèdent l'activité enzymatique C8-E, mais que seule *Salmonella* est ici H_2S positive.

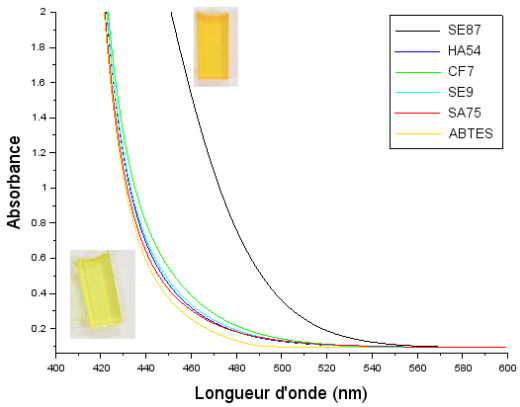


Fig. IV.23 – **Caractérisation de l'activité thiosulfate réductase** pour différentes souches bactériennes, par détection de H_2S en moins de 16 h d'incubation pour deux milieux (présence ou non $Na_2O_3S_2$). Seule ***SE87*** *: Salmonella enterica libère H_2S et est donc thiosulfate réductase.* ***HA54*** *: Hafnia alvei ;* ***CF7*** *: Citrobacter freundii ;* ***SE9*** *: Staphylococcus epidermidis ;* ***SA75*** *: Staphylococcus aureus.*

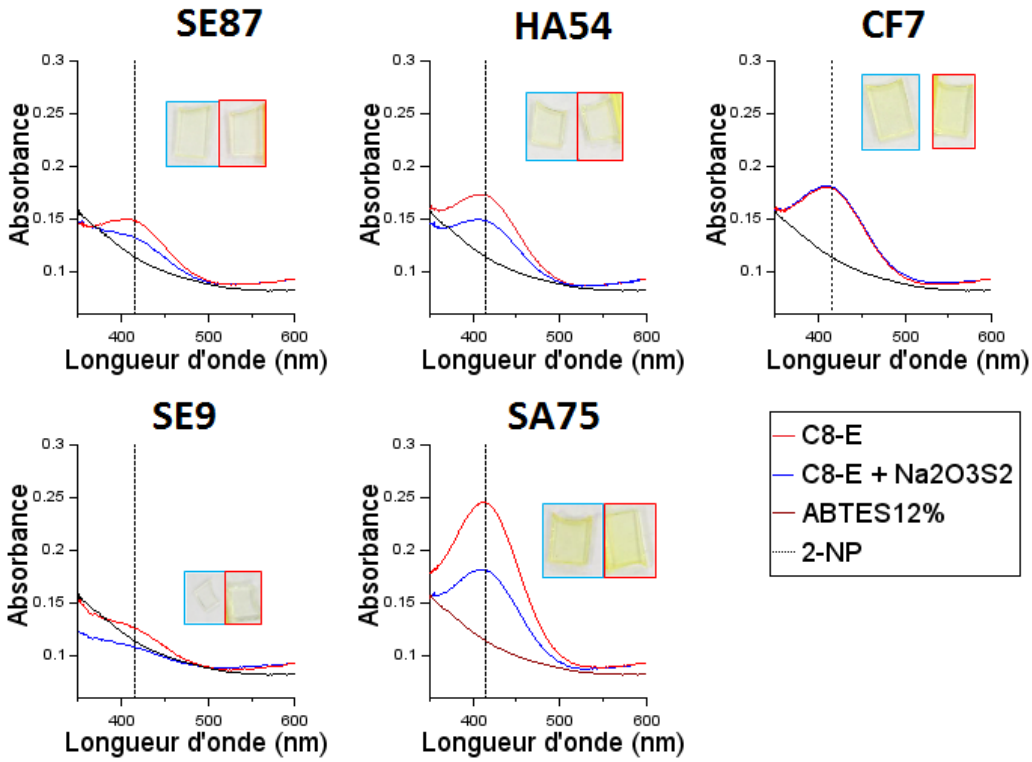


Fig. IV.24 – **Caractérisation de l'activité C8-estérase** pour différentes souches bactériennes, par détection 2-NP en moins de 16h d'incubation pour deux milieux (présence ou non $Na_2O_3S_2$) . ***SE87*** *: Salmonella enterica ;* ***HA54*** *: Hafnia alvei ;* ***CF7*** *: Citrobacter freundii ;* ***SE9*** *: Staphylococcus epidermidis ;* ***SA75*** *: Staphylococcus aureus.*

Conclusion sur les activités C8-estérase, thiosulfate réductase et l'influence du substrat enzymatique

Les expérimentations mettent en évidence que l'ensemble de notre panel de bactéries est C8-E positive. Deux aspects complémentaires peuvent expliquer l'absence de sélectivité de C8-E. Si certaines souches bactériennes clivent directement un substrat enzymatique donné, d'autres ont besoin d'un temps de latence pour activer cette activité enzymatique, elles sont C8-E facultatives.

Pour plusieurs souches bactériennes, il apparait que la détection du 2-NP peut être réalisée avant 16 h. Ce qui remet en avant la question de la spécificité cinétique de l'activité enzymatique.

IV.4.5 Détection de *E.coli* et des *Coliformes*

E.coli et les *Coliformes*, en générale, sont des indicateurs de contamination et de propreté du milieu agroalimentaire. Faiblement pathogènes une tolérance existe pour la plupart de ces espèces. Des exemples courants en agroalimentaire sont ceux des eaux de consommations et de la viande. (cf. Tableau IV.14).

	Eaux de consommations [118]	Viandes [?]
Volume de contrôle	250 mL	250 g
Taux maximum toléré	4 ufc.mL^{-1}	500 ufc.g^{-1}

Tab. IV.14 – **Seuils de tolérance et volume de contrôle pour *E.coli*** dans deux matrices de consommation courante.

Plusieurs voies enzymatiques ont été testées pour une détection de *E.coli via* des xérogels. Si la plupart de ces voies enzymatiques ont beaucoup été étudiées en milieu liquide (β-galactosidase à partir du 2-nitrophényl-β-D-galactopyranoside ou -β-glucuronidase à parti du 2-nitrophényl-β-D-glucuronide) d'autres restent plus anecdotiques (C12-Estérase à partir du 2-Nitrophenyl laurate et β-galactosidase à partir du 2-Naphthyl-β-D-galacto -pyranoside). [44] Ces voies enzymatiques ont été étudiées en phase gazeuse afin de voir si elles permettaient d'apporter de la sélectivité ou de la sensibilité.

L'existence d'un seuil de tolérance, en-dessous duquel la charge bactérienne est tolérée, impose non plus une détection simple mais une numération.

Une méthode de numération basée sur la technique du nombre le plus probable a été mise en place *via* l'activité enzymatique β-galactosidase à partir du substrat 2-nitrophényl-β-D-galactopyranoside.

IV.4.5.1 Détection de l'activité β-GAL par capture du 2-naphtol.

L'activité β-galactosidase des coliformes peut être mise en évidence par la dégradation du substrat enzymatique 2-Naphthyl-β-D-galactopyranoside (β-GAL-2-Nol, FigureIV.25). Lors de l'étude des cartes de fluorescence nous avons vu que le signal du β-naphtol était très étendu. Nous avons ciblé une émission maximum afin de gagner en sensibilité. Celle-ci a été atteinte pour une exposition à 320 nm.

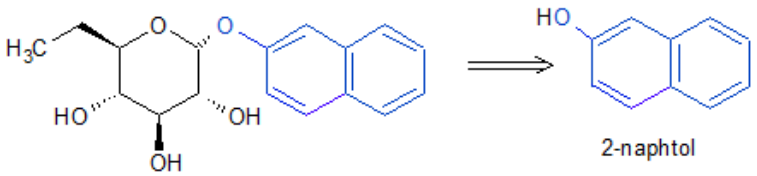


Fig. IV.25 – 2-Naphthyl-β-D-galactopyranoside et le COV libéré le 2-naphtol

L'expérimentation de référence est la détection de E.coli *via* la dégradation du substrat β-GAL-2-Nol dans la mousse au chocolat. Quatre témoins ont été étudiés en parallèle.

a) β-napthol en solution (2,5.10^{-3} mol.L^{-1})

b) β-napthol dans l'EPT (2,5.10^{-3} mol.L^{-1})

c) β-napthol dans l'EPT et de la mousse au chocolat (10^{-3} mol.L^{-1})
d) *E.coli* + β-GAL-2-Nol dans l'EPT (10^5 ufc.mL^{-1})
e) *E.coli* + β-GAL-2-Nol dans l'EPT et de la mousse au chocolat (10^5 ufc.mL^{-1})

Les expositions se font dans des flacons de 200 mL. La charge bactérienne ainsi que la quantité de substrat sont volontairement choisies élevées pour favoriser la cinétique de dégradation du substrat et donc d'émission du COV. La concentration de 2,5.10^{-3} mol.L^{-1} permet d'approcher les 200 ppm en phase gazeuse.

Résultats expérimentaux

Le lot de xérogels TEOS/EtOH/H_2O/ABTES (ratio molaire 1/3,5/11/0,12), synthétisés en salle blanche, dans des cuves polystyrènes, présente une fluorescence intrinsèque avec une bande large d'absorbance mais peu intense, entre 300 et 450 nm.

L'ensemble des graphiques (figure IV.26) montre l'absence de fluorescence induite par l'EPT pour une excitation à 320 nm. Cela est surprenant. En effet, il a été mis en évidence qu'une excitation à 280 nm conduisait à une forte fluorescence après 24 h d'exposition.

Le β-napthol est détecté en solution aqueuse en moins de 24h. L'EPT tend à diminuer légèrement la cinétique de détection. Cette tendance est beaucoup plus marquée en présence de mousse au chocolat.

Les deux expériences, mettant en jeu une suspension de *E.coli*, montrent qu'il n'y a pas d'émission de β-napthol, alors que les comptages confirment la présence de *E.coli*. Ce phénomène peut être lié à plusieurs aspects. Les bactéries ont pu ne pas dégrader le substrat, soit parce que le tensioactif leur en bloque l'accès, soit parce que les autres sources de carbone, issues de la mousse au chocolat, sont préférées par les bactéries. Il est également possible que la fraction de substrat dégradée soit trop faible pour que la quantité de β-napthol soit détectable.

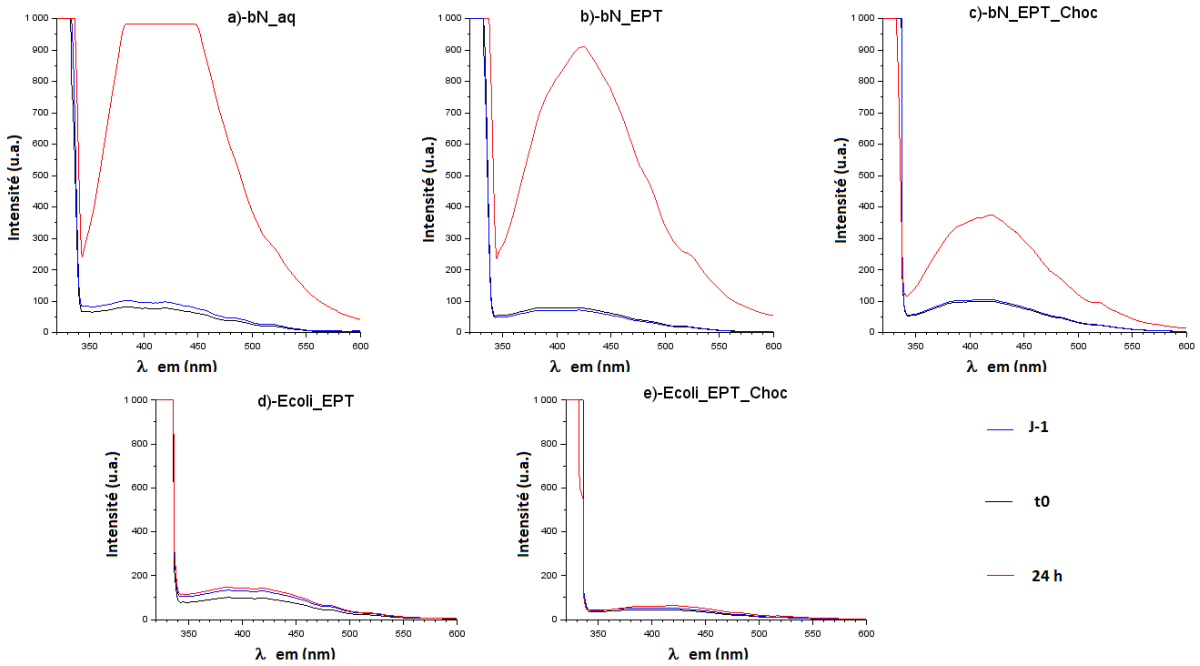


Fig. IV.26 – **Spectre de fluorescence d'expositions de xérogels TEOS** à cinq milieux pour une excitation à 320 nm. Le large pic allant de 320 nm à 340 nm présent sur chaque graphique correspond à la lumière d'excitation diffusée au sein du matériau.

Conclusion sur la détection en fluorescence en général

La détection en fluorescence a été envisagée et étudiée aussi bien pour la détection de COV endogènes que de COV exogènes. En effet, détecter en fluorescence l'indole, COV endogène de *E.coli*, permettrait de s'affranchir d'une détection *via* un capteur DMACA. La simplification des capteurs est particulièrement intéressante. Par ailleurs la détection du β-naphtol permet de diversifier la gamme de COV détectable par dégradation des substrats enzymatiques spécifiques.

La première et principale difficulté rencontrée en spectrométrie de fluorescence avait préalablement été étudiée au chapitre II. Il s'agit de synthétiser puis de conserver des xérogels non-intrinsèquement fluorescents, jusqu'à leur utilisation pour de la détection de COV. Cette contrainte est particulièrement lourde. En effet, elle limite la production de xérogels et de fait le nombre d'expérimentations qui a pu être menées en fluorescence. Afin d'être statistiquement significatifs, l'ensemble de ces tests devraient être reconduits. Les résultats des mesures actuels ne peuvent qu'encourager à l'approfondissement de cet axe de détection.

Dans le cadre de la détection d'*E.coli via* l'indole, la détection a pu être effectuée pour une charge bactérienne très importante. Lors de cette expérimentation, il a été mis en évidence que l'indole est détectable pendant un laps de temps précis. Cette fenêtre

temporelle correspond à la phase de croissance où les bactéries sont suffisamment nombreuses pour libérer de l'indole mais où les nutriments et acides aminés du milieu n'ont pas encore subi de transfert important en phase gazeuse. Le signal de l'indole se distingue alors du bruit de fond issu de la matrice alimentaire.

La seconde étude portait sur la détection de l'activité enzymatique β-GAL *via* la capture du β-naphtol. La détection du COV a pu être effectuée à partir d'une solution au sein d'une matrice alimentaire. Cependant la présence de *E.coli* n'a pu être mise en évidence *via* cette méthode pour les échantillons inoculés. Les travaux montrent que, pour des raisons de solubilité ou de trop faible concentration, le clivage du substrat et la libération du COV n'ont pu être détectés.

La détection de COV en fluorescence apparait donc comme une voie intéressante à poursuivre afin de diversifier les modes de détection. La première étape de ces travaux devra impérativement traiter du verrou majeur de la méthode : la synthèse et la conservation de matériaux non fluorescents *via* un environnement dédié et propre de toutes particules fluorescentes. Après validation d'un procédé de synthèse non fluorescent et répétable, il sera pertinent de s'intéresser à la dégradation des substrats pouvant libérer de COV fluorescent.

IV.4.5.2 Numération de E.coli *via* l'activité enzymatique β-galactosidase par la méthode du nombre le plus probable

La méthode du nombre le plus probable

Il s'agit d'une méthode statistique qui, par dilutions successives, ramène le dénombrement à un problème de détection dans des séries de milieux dilués. Le nombre de milieux positifs et négatifs permet d'obtenir un nombre caractéristique dont l'interprétation à l'aide des tables de Mac Grady permet de déduire la concentration de la solution initiale. [119] La démarche est détaillée en annexe.

La norme ISO 9308-2(2012) est relative au dénombrement de E.coli et des coliformes afin d'évaluer la qualité des eaux de surface et résiduaires. [120] Cette norme met en application la méthode du nombre le plus probable *via* deux voies enzymatiques β-galactosidase (pour l'ensemble des coliformes dont E.coli) et β-glucuronidase (pour E.coli seule). Les substrats enzymatiques employés libèrent, en cas de présence de ces bactéries, du 4-Méthylumbelliférone, qui peut être révélé par rayonnement ultraviolet à 366 nm après 36 à 72 h d'incubation à 44°C $\pm$ 0.5°C.

La norme de ISO 11866-1(2005), relative aux produits laitiers, emploie la méthode du nombre le plus probable pour dénombrer *E.coli*. [121] La transduction par fluorescence

permet de s'affranchir de l'opacité des milieux.

Adapter cette méthode à la détection des COV microbiens en phase gazeuse permet de traiter plus de types d'échantillons, y compris des matrices opaques et complexes. De plus, l'analyse des résultats est simplifiée car il devient alors possible de travailler par colorimétrie sans avoir recours à une instrumentation extérieure.

Montage expérimental

Le montage est composé de deux plaques de 96 puits superposées comme l'illustre la figure IV.27. La plaque inférieure, destinée à recevoir les suspensions bactériennes, est une plaque à puits classiques. Les puits de la plaque supérieure, destinée à maintenir les xérogels, sont, quant à eux, percés (d'un diamètre inférieur à la taille d'un xérogel).

Un joint percé est inséré entre les deux plaques tandis, qu'un joint plein vient se placer au-dessus de la plaque supérieure. Une plaque en polyoxyméthylène et un poids de 2 kg couvrent l'ensemble du montage afin d'écraser les joints et garantir l'étanchéité.

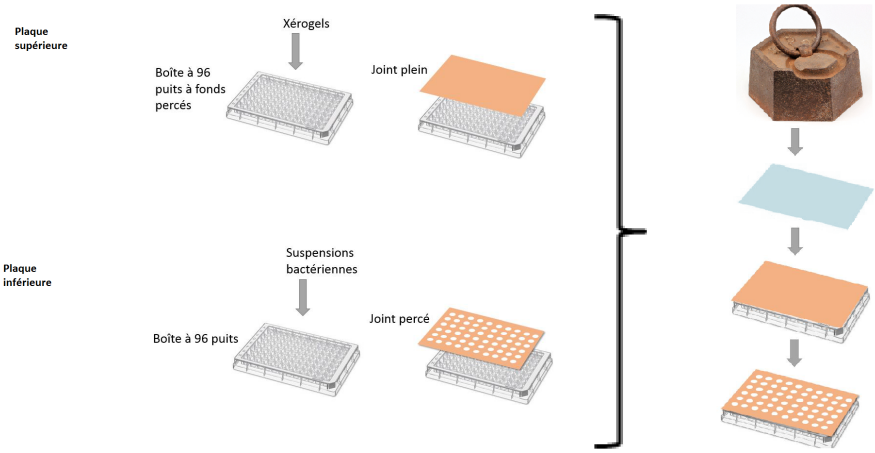


Fig. IV.27 – **Montage utilisé pour le dénombrement par nombre le plus probable.** Deux plaques à 96 puits sont superposées. La plaque inférieure classique contient les suspensions bactériennes, tandis que la plaque percée supérieure accueille les xérogels. Un système de joints et poids permet l'étanchéité.

Protocole

La suspension bactérienne de concentration inconnue est diluée sur plusieurs décades. L'idée est que pour les dilutions les plus fortes, la biomasse soit si faible qu'il y ait 1 ou 0 ufc dans le milieu.

Pour effectuer la preuve de concept de numération en phase gazeuse *via* la méthode de McGrady, la concentration initiale est bien sûr connue. Elle est fixée à $[C_i]=10^8$ ufc.mL^{-1}. Les décades analysées sont : $[C_i].10^{-6}$, $[C_i].10^{-7}$ et $[C_i].10^{-8}$.

Pour chaque décade de dilution, plusieurs essais sont réalisés afin d'avoir une méthode statistique. L'expérience présentée ici comprend trois décades de dilutions et cinq tests par décades. La suspension la plus concentrée correspond à une dilution par 10^4.

Le milieu contient 200 μL de substrat β-gal-2NP à 540 μmol.L^{-1} dans de l'EPT. La concentration en substrat β-gal-2NP est constante entre tous les puits, seule la concentration bactérienne est diluée. Après superposition des deux plaques à puits, les xérogels sont introduits dans la plaque supérieure au-dessus des suspensions bactériennes. L'ensemble est ensuite laissé à l'incubateur à 37°C pendant 24h sous agitation 20 rpm.

En parallèle, une numération sur boîte est effectuée afin d'évaluer les résultats issus de la méthode du nombre le plus probable appliqué en phase gazeuse.

En présence de bactéries, le substrat est clivé ; ce qui libère du 2-NP. Le xérogel prend alors une couleur jaune. En l'absence de bactéries, le β-gal-2NP n'est pas dégradé ; le xérogel demeure incolore.

Le ratio des xérogels positifs et négatifs de chaque décade permet, *via* les tables de McGady, de connaitre la concentration bactérienne dans la solution initiale.

Résultats expérimentaux

L'étanchéité de notre montage n'est pas complète. Certains xérogels, exposés à des puits sans bactéries, présentent une légère couleur jaune. Néanmoins ce désagrément est moindre. En effet, les xérogels exposés aux bactéries sont jaunes vifs. Cette distinction des positifs/négatifs est corroborée par la spectrométrie d'absorbance ; les deux groupes présentent des spectres distincts. La figure IV.28 montre les résultats.

Pour un essai, comme ici sur trois décades de dilutions avec cinq tests, le nombre caractéristique est formé de trois chiffres. Chaque chiffre correspond au nombre de tests positifs par décade. Le nombre caractéristique est donc ici : 5-5-2

En se rapportant aux tables de McGrady fournies en annexe, il apparait que le nombre le plus probable est de 54 ufc par puits dans la première dilution. [C$_i$].10^{-6}. Le calcul de la concentration dans la solution initiale est décrit par l'équation IV.1, elle est de 2,7.10^8 ufc.mL^{-1}.

$$[C_i] = \frac{NPP.k}{V} \tag{IV.1}$$

NPP : nombre le plus probable (ufc) - k : facteur de dilution de la décade de plus forte concentration - V : le volume d'essai (mL)

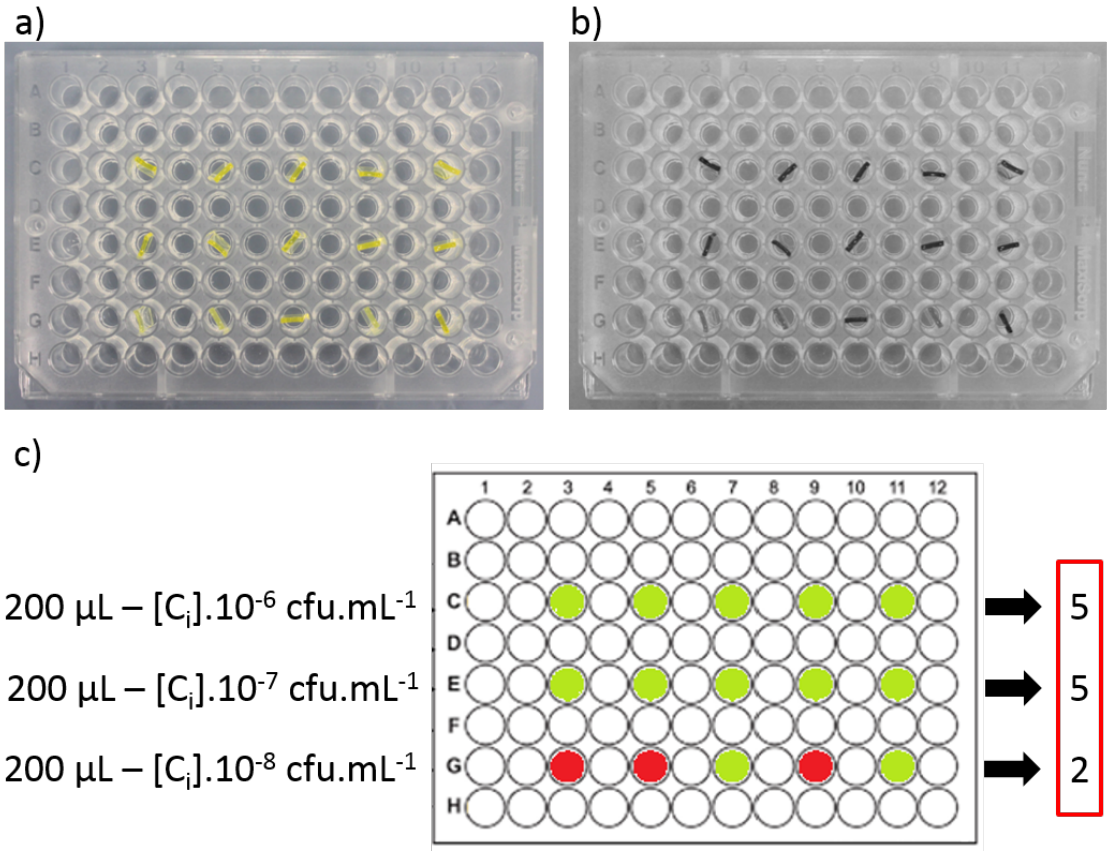


Fig. IV.28 – **Xérogels après exposition lors d'une numération par nombre le plus probable de *E.coli* pour une matrice à trois dilutions et cinq tests.** a) Photographie au point final. b) Photographie traitée sous ImageJ, afin de faire ressortir les contrastes. Le filtre appliqué permet de faire apparaitre noires les couleurs complémentaires du bleu. c) Schématisation des résultats. [C_i] est la concentration initiale recherchée. Les ronds verts correspondent aux résultats positifs, les rouges aux négatifs. Les chiffres encadrés forment le nombre caractéristique

Le calcul de l'intervalle de confiance à 95% conduit à la gamme [7,5.10^7 ; 8,5.10^8] ufc.mL^{-1}. La numération par comptage sur boites donne une valeur de 1,2.10^8 ufc.mL^{-1} valeur englobée par l'intervalle de confiance de la méthode NNP. L'ensemble de ces résultats est en adéquation avec notre inoculation de départ 10^8 ufc.mL^{-1}.

Le tableau IV.15 présente les résultats pour des expérimentations à cinq, huit et dix essais par décade.

La meilleure cohérence entre la méthode de référence et la méthode NNP est obtenue pour le test à huit essais par décade. Il est important de remarquer qu'il s'agit du seul test pour lequel les deux décades supérieures ne sont pas complètement positives.

Lorsque plus d'une décade de puits est entièrement positive, cela indique qu'il est possible de gagner en précision statistique en travaillant dans des milieux plus dilués. Ainsi, pour les tests à cinq et dix essais par décades, dont les nombres caractéristiques sont respectivement 5-5-2 et 10-10-6, il serait intéressant de travailler avec de dilution à 10^{-7} ; 10^{-8} et 10^{-9} afin de gagner en précision.

Valeur cible		0,5 McF $\simeq 10^8$ ufc.mL^{-1}		
NPP en phase gazeuse				
Décades de dilutions testées		10^{-6} ; 10^{-7} ;10^{-8}	10^{-6} ; 10^{-7} ;10^{-8}	10^{-6} ; 10^{-7} ;10^{-8}
Nombres d'essais par décades		5	8	10
Nombre caractéristique		5-5-2	8-7-5	10-10-6
Concentration	ufc.mL^{-1}	2,7.10^8	1,90.10^8	4,6.10^8
Intervalle de confiance	ufc.mL^{-1}	[7,5.10^7 ; 8,5.10^8]	[7,5.10^7 ; 3,6.10^8]	[1,7.10^8 ;9,2.10^8]
Méthode de référence	ufc.mL^{-1}	1,2.10^8	1,9.10^8	1,7.10^8

Tab. IV.15 – **Résultats de numérations pour des tests à cinq, huit et dix essais par décade de dilution.** Les numérations de McGraddy en phase gazeuse conduisent à des valeurs analogues à la méthode de référence.

Cette nouvelle méthode combinant analyse statistique, par la méthode du nombre le plus probable, et détection en phase, grâce aux capteurs de 2-NP, montre sa capacité à énumérer des bactéries avec le même intervalle de confiance que les méthodes classiques de comptage sur boites.

Cette méthode est adaptable à d'autres COV et/ou voies enzymatiques d'intérêt. Elle est, par ailleurs, compatible avec l'usage d'inhibiteur afin de garantir la spécificité de la numération.

IV.5 Détection multi-capteurs

L'expérimentation décrite ci-dessous vise à évaluer deux paramètres. Il s'agit d'une part d'évaluer la pertinence d'un sac d'homogénéisation (Stomacher VWR) instrumenté, mais aussi de mettre en œuvre la détection multi-capteurs.

Afin d'accueilir les xérogels, le sac d'homogénéisation est muni de logements (Figure IV.29). Ceux-ci sont composés d'un scotch Gene Frame stérile qui permet de fixer une poche filtrante également sétrile.

L'instrumentation directe d'un sac d'homogénéisation permettrait de coupler croissance bactérienne et détection. Cependant la géométrie d'un tel sac est très différente des montages précédents, de faite la migration et le comportement de COV peut être fortement impacté. De plus les volumes analysés sont nettement plus conséquents (centaines de millilitres), entrainant une dilution des COV, ce qui peut être un frein à la détection.

La détection multi-capteurs implique l'utilisation de plusieurs capteurs différents en parallèle. Chaque capteur cible et révèle un COV particulier. Cependant l'ensemble des COV vont être captés par les différents capteurs. Il y aura donc un effet de dilution des COV au sein des trois capteurs. La fraction de COV captée par son capteur révélateur sera-t-elle suffisante pour le détecter ? Cette question de sensibilité est primordiale en effet

si la transduction est spécifique, la capture des COV par les xérogels ne l'est pas. Ainsi les COV se repartissent au sein des différents xérogels en présence de manière non spécifique.

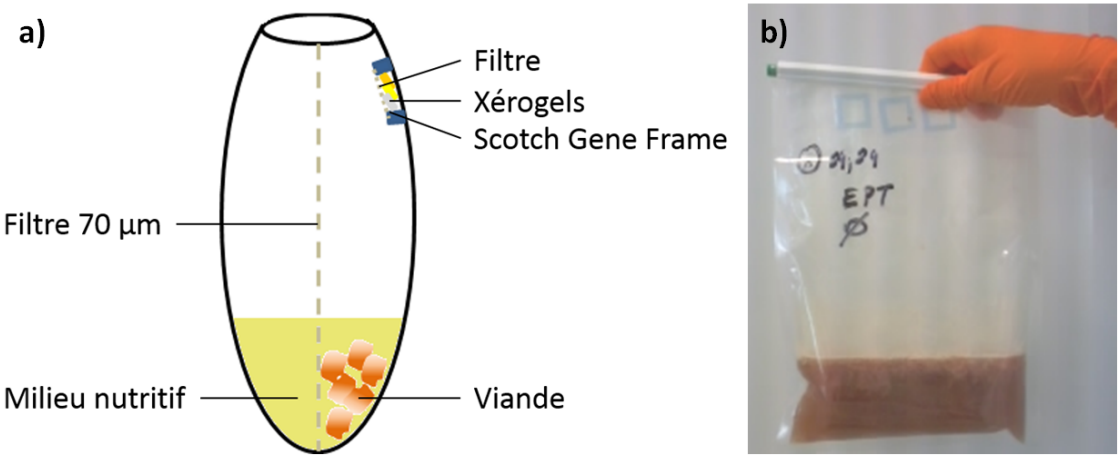


Fig. IV.29 – **Sac d'homogénéisation Stomacher instrumenté** : Schéma(a) et photographie(b)

La matrice alimentaire testée se compose d'aiguillettes de poulet achetées sous vide en grande surface. Trois COV dont la détection est assurée par trois capteurs ont été ciblés. L'activité $\beta - glucuronidase$ a été recherchée *via* la dégradation du substrat β-GUR-2NP. La détection de l'H_2S a été ciblée par un capteur DTNB. La mise en évidence de l'indole a été recherchée en continu à l'aide d'un capteur DMACA-PSS-TFA puis en point final par un capteur DMACA catalysé HCl.

La charge bactérienne introduite est très nettement supérieure aux normes en vigueur. Il s'agit en effet d'observer si la détection est réalisable. L'ensemble du protocole expérimental est détaillé en annexe (p. 192).

Des spectres d'absorbance de chacun des xérogels sont réalisés à t_0, 8 h, 24 h, 32 h et 48 h.

Les spectres de xérogels DMACA catalysés HCl sont mesurés à t_1=t_0 +48 h, t_1 +2 h, t_1 + 4 h, t_1 + 8 h.

Résultats expérimentaux

Le tableau IV.16 présente les résultats de l'exposition des xérogels à deux bactéries et un milieu témoin au sein d'un sac stomacher instrumenté ainsi que dans les tubes. L'ensemble des milieux a émis de l'H_2S et de l'oNP tandis que, dans aucun cas le capteur DMACA-PSS-TFA ne révèle la présence d'indole. Alors que les capteurs DMACA-HCl révèlent rapidement la présence d'indole.

Le format d'analyse en tubes conduit à une détection plus précoce que le format sac stomacher instrumenté. Il est également important de remarquer que la cinétique de

détection est plus rapide pour les échantillons artificiellement inoculés *E.coli* que pour les échantillons contenant uniquement la flore locale.

		t_0			$t_1=t_0$ +48h
	COV ciblé	Indole	H_2S	2-NP	Indole
	Formulation Xérogel	DMACA-PSS-TFA	DTNB	ABTES15%	DMACA-HCl
Sac	*EC28*	-	+ 32 h	+ 32 h	+ 8 h
Sac	*HA54*	-	+ 48 h	+ 48 h	+ 8 h
Sac	Témoin / flore locale	-	+ 48 h	+ 48 h	+ 8 h
Tubes	*EC28*	-	+ 8 h	+ 8 h	+ 2 h
Tubes	*HA54*	-	+ 24 h	+ 24 h	+ 2 h
Tubes	Témoin/ flore locale	-	+ 24 h	+ 24 h	+ 2 h

Tab. IV.16 – **Résultats de l'exposition des capteurs au sein d'un sac instrumenté et de tubes individuels.** Les - figurent l'absence de détection, les + les échantillons positifs. Les temps précisés à coté correspondent aux temps de détection. Le cas du xérogel DMACA-PSS-TFA, exposé à *EC28* en tube individuel, est intéressant. En effet, après 48 h une bande d'absorbance à 360 nm est visible. Il ne s'agit pas de l'indole mais, probablement, de la forme protonée du 2-NP. La capture des COV par les xérogels n'est pas spécifique.

Flore locale

Les comptages effectués sur l'échantillon témoin ont révélé la présence d'une flore locale présente initialement dans la matrice alimentaire. Cette flore locale a conduit à une détection positive des capteurs H_2S, 2-NP et DMACA-HCl. La dégradation du substrat par la flore locale est cohérente avec des *coliformes*. L'émission de l'indole et d'H_2S oriente vers *E.coli*. Une culture sur milieu chromogénique ChromID coli indique la présence de *coliformes* et de *E.coli*.

La présence de cette culture pose la question des témoins. Ici en effet, la non stérilité de la matrice perturbe l'expérimentation. Les trois conditions de culture (*EC28*, *HA54* et Témoin) conduisent de par la présence de la flore locale à la même réponse : seul le sac instrumenté et le tube, où *EC28* a été inoculée, se distinguent par une cinétique de détection plus rapide.

Effet de confinement

La comparaison des essais en sac d'homogénéisation instrumenté et en tubes montre que les tubes conduisent à une détection en moyenne 24 h avant les sacs instrumentés. Ces résultats mettent en évidence que l'effet de confinement est favorable à la détection. L'utilisation de sacs instrumentés était motivée par la volonté d'analyser une masse de 25 g de viande afin de se rapprocher des normes en vigueur. Cette démarche conduit à

un volume d'environ deux tiers du volume du sac. Par ailleurs, il est difficile de placer les xérogels plus bas dans le sac, d'une part cela augmenterait le risque d'introduire des contaminations apportées par l'expérimentateur lors de l'introduction des xérogels et, d'autre part les xérogels pourraient recevoir de projections des milieux lors de l'agitation. La géométrie du tube est plus favorable. En effet le volume mort ne représente que la moitié du tube, il est donc proportionnellement au volume total beaucoup plus faible dans le cas du montage en tube que dans celui du sac d'homogénéisation. De plus, les xérogels sont spatialement plus proches du milieu.

Par ailleurs, le xérogel DMACA-PSS-TFA exposé à *EC28* en tube individuel présente après 48 h une bande d'absorbance à 360 nm. Il ne s'agit pas de l'indole mais probablement de la forme protonée du 2-NP. Ce phénomène met en évidence que la capture des COV par les xérogels n'est pas spécifique contrairement à la transduction.

IV.5.1 Conclusion et perspectives

La présence d'une flore locale, au sein d'échantillons achetés dans le commerce, pose la question des témoins. En effet, pour avoir de vrais témoins, il est nécessaire d'avoir des matrices alimentaires stériles ; l'une des méthodes testées pour stériliser les viandes commerciales est l'irradiation aux rayons gamma.

Cependant cette flore locale a pu être détectée et identifiée *via* le système multicapteur. Le résultat est donc mitigé. Certes, la détection et l'identification de *E.coli* en flore locale a été possible mais, d'une part, les temps de détection sont trop longs pour une application industrielle et, d'autre part, elle a nécessité le recours à la formulation DMACA-HCl qui est incompatible avec la présence d'autres capteurs. Enfin, le prototype instrumenté visait à répondre aux critères de sécurité des denrées alimentaires du journal officiel de l'Union Européenne qui impose d'analyser une masse donnée [9] de matrice alimentaire. Cependant, ce premier prototype montre des limites dans la diffusion des COV au sein du sac. D'une part, les xérogels sont trop éloignés de la matrice alimentaire pour être efficacement en contact avec les COV. D'autre part, le volume d'air au-dessus de la matrice dilue la concentration de COV en phase gazeuse. Cependant, pour que la croissance bactérienne ciblée(en aérobie) puisse avoir lieu la quantité d'oxygène disponible doit restée suffisante. Aussi, un optimum entre ces deux paramètres doit être déterminé. Le couplage avec un système micro fluidique permettrait d'orienter le flux, favorisant son passage au sein des xérogels et une concentration du COV au sein du matériau. Une meilleure sensibilité serait de fait attendue.

9. Dans le cas de *Salmonella*, par exemple, une absence de la bactérie doit être constatée dans 25 g pour les viandes hachées et préparations de viande destinées à être consommées crues ainsi que les viandes hachées et préparations de viande de volailles destinées à être consommées cuites

Effet de confinement

La comparaison des essais en sac d'homogénéisation instrumenté et en tubes montre que les tubes conduisent à une détection en moyenne 24 h avant les sacs instrumentés. Ces résultats mettent en évidence que l'effet de confinement est favorable à la détection. L'utilisation de sacs instrumentés était motivée par la volonté d'analyser une masse de 25 g de viande afin de se rapprocher des normes en vigueur. Cette démarche conduit à un volume d'environ deux tiers du volume du sac. Par ailleurs, il est difficile de placer les xérogels plus bas dans le sac ; d'une part, cela augmenterait le risque d'introduire des contaminations apportées par l'expérimentateur lors de l'introduction des xérogels, et d'autre part les xérogels pourraient recevoir de projections des milieux lors de l'agitation. La géométrie du tube est plus favorable. En effet, le volume mort ne représente que la moitié du tube, il est donc proportionnellement au volume total beaucoup plus faible dans le cas du montage en tube que dans celui du sac d'homogénéisation. De plus les xérogels sont spatialement plus proches du milieu.

IV.6 Conclusion sur la détection de COV ciblés pour l'identification de pathogènes

La détection des COV ciblés s'est fait en couplant plusieurs modes de transduction et voies enzymatiques. Cette combinaison avait pour but de distinguer des pathogènes courant cause d'infections majeures. Ainsi *E.coli* a été ciblée *via* son COV caractéristique l'indole. La quantité de pont disulfure, présente naturellement dans le milieu nutritif, s'est révélée trop faible pour être détecté : du $Na_2S_3O_2$ a dû être rajouté pour mettre en évidence l'activité chez *Salmonella* et *E.coli*. Les activités α-glucosidase et C8-estérase ont été révélées chez la plupart des bactéries de notre panel de façon plus ou moins significative. Cela empêche une identification directe *via* la spécificité enzymatique.

E.coli s'est avérée être capable de dégrader l'ensemble des substrats enzymatiques que nous avons testés. De plus, les cinétiques de dégradation des substrats par *E.colis* ne sont pas très éloignées de celles des pathogènes comme *S.aureus* et *Salmonella*. Ce constat montre les limites de la détection par voies enzymatiques. En effet, *E.coli* est une bactérie extrêmement commune ; sa croissance, au sein de matrices alimentaires risque d'induire un nombre considérable de faux-positifs.

E.coli est Gram négative (Gram$^-$), contrairement à *S.aureus*. L'ajout d'un anti-Gram$\hat{}$ au milieu permettrait d'inhiber la croissance *E.coli* tout en préservant celle des staphylocoques. Cependant, *Salmonella* étant elle aussi Gram$^-$, cette méthode ne peut donc être appliquée pour spécifier sa détection. En revanche, la présence de *E.coli* induit la production d'indole. La distinction entre *E.coli* et les autres bactéries peut donc

être envisagée par ce biais. Cependant la détection de l'indole microbien *via* les xérogels est difficile à mettre en œuvre. D'un côté, l'absorbance sans sonde et la fluorescence montrent de nombreuses interférences liées aux milieux ainsi que l'impossibilité d'obtenir une bonne répétabilité. De l'autre côté, l'absorbance avec sonde spécifique nécessite une catalyse acide de la réaction. Les capteurs catalysés TFA sont peu sensibles ; ils risquent d'aboutir à de nombreux faux-négatifs, tandis que l'usage de capteurs catalysés HCl impose de repenser les protocoles d'analyse. Soit il nécessite la mise en place d'un deuxième échantillon uniquement destiné à l'exposition du xérogel DMACA catalysé HCl. Soit le capteur DMACA est exposé, au milieu, en toute fin de croissance après l'analyse *via* les autres xérogels. Cette dernière méthode rallonge l'expérimentation mais est la plus pertinente du fait de la forte réactivité du DMACA et de l'indole en présence de HCl. Un système de bulle plastique perçable a ainsi été envisagé. Cependant, ce montage ne permet pas une détection précoce.

En définitive, la spécificité enzymatique apparait être liée à la cinétique de détection. Certaines souches de bactéries clivent le substrat quasi spontanément, tandis que d'autres ont besoin d'un temps de latence avant de le dégrader. Il apparait intéressant, de prime abord, de mettre en place un protocole de spécificité enzymatique basé sur la cinétique du capteur de COV. Cependant, cette démarche est complexe. En effet, la cinétique de capture du COV dépend de la quantité de COV libérée donc de la charge bactérienne à t_0, qui n'est, par définition, pas connue, lors d'un contrôle sanitaire. Pour s'affranchir de son effet, il faudrait normaliser l'absorbance du xérogel par la charge bactérienne. Cependant, cette méthode impose une étape de numération en parallèle. Or, cela s'avère limitant car, la numération sur boîte peut s'avérer très complexe si l'échantillon est poly-microbiens. Au vu de ces contraintes, la technologie perd de son intérêt au profit des milieux spécifiques chromogéniques sur boites de Pétri.

Conclusion générale

La sécurité sanitaire est l'un des enjeux majeurs de l'industrie agroalimentaire. Les méthodes de détection et d'identification des pathogènes tels que *E.coli*, *S.aureus*, *Salmonella* sont donc d'une importance primordiale. Ces techniques doivent allier sensibilité et spécificité sur le plan microbiologique tout en étant facile d'usage, avec un faible coût de revient.

L'analyse des métabolites microbiens en phase gazeuse est la voie que nous avons explorée pour répondre à ce besoin. En effet, l'analyse des COV permet, d'une part, de s'affranchir de la complexité du milieu de culture et de prolifération et, d'autre part, d'apporter un caractère non invasif au contrôle.

Ces travaux de thèse se sont donc inscrits dans un contexte de capteurs en phase gazeuse, sélectifs, rapides, faciles à utiliser, ayant un faible coût de revient. La mise en place de capteurs chimiques permet d'obtenir des sélectivités particulières et complémentaires. L'emploi de matériaux sol-gel vise, quant à lui, à accroitre la sensibilité par accumulation et permettre une transduction optique tout en obtenant un capteur préhensible.

Deux axes ont donc été étudiés. Le premier traite de l'analyse globale du profil olfactif, c'est-à-dire d'une fraction du métabolome volatil d'un pathogène. Deux modes de transduction (spectrométrie d'absorbance et de fluorescence) ont été considérés. Le second axe est une analyse partielle, ciblée sur les COV les plus significatifs par les biais de réactions sonde-cible pour les COV endogènes et d'activité enzymatiques dans le cas de COV exogènes.

Pour répondre à la problématique que pose une analyse globale du profil olfactif deux démarches ont été menées. La mise en place d'un nez colorimétrique étudie les différentes interactions chimiques qu'il est possible de mettre en évidence entre les COV microbiens et des molécules chimiosensibles choisies en fonction de leurs propriétés et réactivités. L'analyse de matrices d'excitation-émission (EEM) de fluorescence vise à cibler et identifier les COV à l'aide d'un unique capteur sol-gel grâce à un double balayage en longueurs d'onde. L'analyse des EEM a tout d'abord été effectuée en solution aqueuse puis confrontée à la transposition en matrice nanoporeuse.

Le nez colorimétrique testé regroupe onze xérogels contenant des molécules chimiosen-

sibles. Ces molécules sondes ont été sélectionnées en fonction de leur réactivité (acide-base de Lewis et de Brønsted, solvatochromisme ou encore réaction covalente). Leur état initial au sein des monolithes de xérogels est contrôlé par le groupement fonctionnel (chaine alkyle ou groupement NH_2) porté par les précurseurs fonctionnalisés. L'évaluation des spectres d'absorbance a été étudiée par analyse en composantes principales. La confrontation du nez colorimétrique à des COV modèles n'a pas conduit à des résultats pertinents. Il a, par contre, été possible de détecter la présence de bactéries sur géloses, sans toutefois parvenir à distinguer les espèces. Dans un milieu d'hémoculture, il n'a pas été possible de s'affranchir des composés relargués provenant de l'échantillon. L'étude des valeurs propres issues de la PCA montre que l'information utile est obtenue grâce aux capteurs acido-basiques. Dans ce cas, ce mode de traitement de données n'apporte pas plus d'information qu'une simple lecture colorimétrique.

L'exploitation des matrices d'excitation-émission de fluorescence issues d'un double balayage en longueur d'onde a été mis en œuvre sur deux COV modèles l'indole et le β-naphtol en solution aqueuse. La détection est réalisée mais la distinction entre composés s'avère délicate. La transposition de la méthode au sein d'un matériau xérogel s'est avérée conditionnée par la production de xérogels non fluorescents. L'élaboration d'un protocole de synthèse dédié a permis d'obtenir un nombre de monolithes permettant de réaliser la détection de COV *via* les xérogels. Les COV sont alors issus de solutions aqueuses. Comme lors de la caractérisation directe des liquides, la détection est permise mais les motifs formés par les deux COV ne sont pas assez distincts pour permettre une identification. Cette approche a montré la grande sensibilité des sol-gels aux polluants extérieurs. Ces interférents, certes néfastes à la détection des pathogènes, montrent néanmoins le potentiel de la détection par fluorescence en terme de sensibilité. Ainsi, la détection par fluorescence demeure une voie très intéressante et prometteuse mais nécessite un contrôle parfait de la production et du stockage avant usage.

L'analyse globale du profil olfactif s'étant révélée difficile à mettre en œuvre, que ce soit par la mise en place d'un nez colorimétrique ou l'analyse d'une matrice d'excitation-émission, il a par la suite été préféré de ne cibler que certains COV d'intérêt majeur. Il s'agit soit de COV endogènes caractéristiques d'une bactérie d'intérêt en agroalimentaire soit de COV exogènes révélant une activité enzymatique spécifique.

Le mode de détection le plus courant pour la détection de COV endogènes est lié à des réactions sondes-cibles spécifiques. L'adsorption des COV dans la matrice est non spécifique, alors que la transduction mise en place doit l'être le plus possible. La détection de H_2S et des mercaptans par rupture du pont disulfure de la molécule DTNB est une méthode répandue. Des travaux antérieurs ont mis au point un capteur TMOS basé sur cette réaction. Il a donc été proposé ici de transposer cette réaction au sein d'une

matrice TEOS dont les sous-produits ne sont pas cancérigènes, et d'étudier les propriétés réactionnelles des capteurs. Celles-ci étant dégradées, l'intérêt d'un tel capteur dépend du choix entre efficacité et contrainte de synthèses liées aux produits cancérigènes. La détection de l'indole se fait par réaction du COV avec le composé DMACA. Or cette réaction nécessite une catalyse par un acide forte. La formulation classique est catalysée par de l'HCl. Pour des raisons de relargage de l'acide, cette formulation ne peut être utilisée en présence d'autres capteurs sol-gel. Il a donc été proposé de substituer l'HCl. Les limites de détection obtenues pour les différentes formulations mises au point restent moins performantes que pour la formulation catalysée HCl. 200ppb d'indole sont détectés en 2 h par les formulations catalysées au TFA contre seulement 10 mn pour la formulation catalysés HCl.

La problématique de la substitution de l'HCl peut être poursuivie en incorporant de l'acide paratoluènesulfonique. Cet acide présente un pKa très acide, -1.34, ainsi qu'une constante de Henry faible, $1{,}11.10^{-7}$: il est donc peu volatil.

La mise en place de réactions sonde-cible au sein de xérogel étant complexe et pas toujours adaptable aux détections multi-capteurs, une autre voie explorée a été la détection intrinsèque des COV. L'indole a ainsi pu être détecté par absorbance et fluorescence sans sonde. Outre les COV endogènes, deux COV exogènes ont été détectés sans molécule sonde. Lors de ce type de détection, la spécificité provient de l'activité enzymatique mise en œuvre lors de la dégradation du substrat et la libération du COV. Trois bactéries, *E.coli*, *S.aureus* et *Salmonella*, ont ainsi été ciblées à partir de leur activité enzymatique respective. La transposition de ce type de détection à une transduction sol-gel a soulevé plusieurs points.

La spécificité enzymatique s'avère une question de cinétique de clivage du substrat et de détection du COV : la vitesse de libération du COV est directement liée à la préférence ou non des bactéries pour dégrader le substrat plutôt que les sources de carbone disponibles dans le milieu ; l'accumulation du COV dans le sol-gel dépend de la solubilité des métabolites dans le milieu et de leur capacité à passer en phase gazeuse. Plusieurs bactéries peuvent ainsi être capables de dégrader un même substrat, l'activation de la voie enzymatique, dépendante de leur métabolisme et de l'environnement dans lequel elles se trouvent, peut-être plus ou moins retardée. Pour ne cibler qu'une seule espèce, et s'assurer qu'il y ait corrélation entre détection du COV et présence de l'espèce recherchée, il est donc nécessaire de coupler cette recherche d'activité enzymatique avec l'usage d'inhibiteurs de croissance spécifique pour cibler une bactérie. Ce travail sur les voies enzymatiques spécifiques a été l'occasion de mettre en place une méthode de numération de *E.coli via* la voie enzymatique β-GAL selon la méthode du nombre le plus probable et les tables de McGraddy. Les numérations ont pu être effectuées selon des tests à cinq, huit et dix essais par décade de dilution. Cette méthode permet de répondre à la problématique

des seuils de bactéries tolérées dans les matrices alimentaires, comme c'est souvent le cas pour *E.coli*, plus rapidement que par la méthode standard, qui est le comptage sur boites.

Enfin un test multicapteurs a été mené sur un échantillon commercial de viande de poulet. Les normes sanitaires imposent le contrôle d'un volume donné de matrice alimentaire. Aussi le format de l'expérimentation choisi a été celui de sacs d'homogénéisation instrumentés. Il s'agissait de détecter et de distinguer *Escherichia coli* et *Hafnia alvei*. Ce test a mis en évidence la non spécificité des capteurs des COV par les différents monolithes. Un compromis est donc nécessaire entre la multiplication du nombre de capteurs différents afin d'avoir l'identification la plus précise possible et l'accumulation non sélective du COV au sein des capteurs tend à retarder la transduction donc la détection. La flore locale nous a privé de témoins sans bactérie mais a montré la capacité de nos capteurs à détecter la présence de bactéries à des concentrations admises dans les circuits agroalimentaires.

Ces travaux ont donc mis en évidence les limites et les contraintes que présentent chacune des voies étudiées. Elles sont globalement liées au manque de spécificité de la réponse : la détection de pathogène est aisée, leur identification est, elle, plus complexe.

La caractérisation approfondie et systématique des matériaux, notamment par analyse BET et SAXS permettra d'aboutir à une connaissance fine et précise de la structure et de la porosité des xérogels. Contrôler la chimie de surface permettra d'élaborer une gamme complète de matériaux répondant à des cahiers de charges distincts. Par ailleurs, le format monolithique des xérogels, qui était *a priori* facile de mise en forme et d'utilisation, se révèle ne pas être adapté pour gagner en sensibilité. En effet, l'épaisseur du matériau est un frein, dû au temps nécessaire à la diffusion du gaz à l'intérieur. Augmenter le rapport surface sur volume du xérogel permettrait d'atteindre plus rapidement l'équilibre d'accumulation et de gagner en cinétique de détection *via* l'utilisation de couches-minces.

Les couches-minces offrent de plus la possibilité d'être couplées avec d'autre mode de transduction très sensibles comme de la résonance des plasmons de surface (SPR) avec le dépôt d'une couche sol-gel fonctionnalisée à la surface du prisme. Les couches minces sol-gel devront être plus fines que l'onde évanescente. L'épaisseur du sol-gel permettra d'utiliser l'onde évanescente non plus uniquement sur une surface mais dans un volume. L'un des défis de cette technologie sera d'inclure des ligands dans le sol-gel, tout en conservant leur accessibilité.

ANNEXES

Annexe A

Compléments expérimentaux

A.1 Chapitre II

A.1.1 Formulations

Formulation TMOS : Les formulations TMOS/MeOH/H_2O/Précurseur fonctionnalisé présentent les ratios molaires suivants 1/5/4/X. La quantité, X, de précurseur ajoutée est variable selon les formulations. [59]

Certains précurseurs fonctionnalisés catalysent la réaction d'hydrolyse par leur groupement fonctionnel. C'est par exemple le cas des groupements aminés : les précurseurs fonctionnalisés ABTES ou APTES. La gélification intervient d'autant plus vite que la quantité précurseur fonctionnalisé introduite est importante. Dans ce cas il est nécessaire de refroidir pour ralentir la vitesse de réaction. Le mélange a lieu à -20°C dans un ballon refroidi par un bain d'éthanol et d'azote liquide. Selon les précurseurs fonctionnalisés et leur pouvoir catalytique ou non sur la réaction d'hydrolyse, le mélange pourra être effectué dans un bain de glace ou à température ambiante.

Le TMOS et le méthanol sont mélangés dans un ballon. Puis le précurseur fonctionnalisé éventuel est ajouté. L'eau est le dernier élément incorporé dans la formulation. Le sol obtenu est laissé sous agitation pendant une minute, avant la mise en forme.

Formulation TEOS : Les formulations TEOS/TEP/H_2O/Précurseur fonctionnalisé présentent les ratios molaires suivants 1/0,6/11/X. La quantité, X, de précurseur fonctionnalisé (ABTES ou n-butyl) ajoutée est variable selon les formulations.

Le TEOS, le TEP et l'eau MilliQ ainsi que l'acide citrique sont pré-hydrolysés sous agitation 2 h à 45°C, puis 2 h à température ambiante. La solution ainsi obtenue est homogénéisée.

Le ballon de réaction est alors placé dans un bain à de glace. Le précurseur fonctionnalisé est alors ajouté et la solution est laissée à agiter 10 min supplémentaires.

Mise en forme

Monolithes parallélépipédiques : Les moules sont des cuves en polystyrène (EVERGREEN, Spectrovettes semi micro, 201-3111). Pour obtenir des monolithes de 2 mm d'épaisseur, 1 mL de sol est introduit dans chaque cuve. En effet, au cours du procédé, un rétreint est observé dans les trois dimensions. Il est également possible de synthétiser des xérogels de 800 µm d'épaisseur. Pour cela, trois plaquettes de silicium [1] de 0,74 mm d'épaisseur sont préalablement introduites dans les cuves, puis 300 µL de solution sont introduits dans la cuve. Il est nécessaire de verser doucement pour éviter la formation des bulles mais suffisamment rapidement pour éviter une gélification dans le cône de la pipette. Régulièrement, des bulles sont piégées dans le gel. Pour obtenir une homogénéité optique[2], il convient de les extraire par une action mécanique avant gélification.

Mise en forme de pastilles plates : Les moules sont, ici, des plaques à 36 puits. 150 µL sont introduits par puits. Cette mise en forme permet une production de lots beaucoup plus conséquente mais interdit les caractérisations par spectrométrie. Elle sera donc réservée à une détection purement visuelle et colorimétrique.

Gélification et séchage : Le séchage a pu avoir lieu à température ambiante sous hotte ou à 45°C en étuve. Dans le cas des monolithes parallélépipédiques, les cuves sont fermées par un bouchon et parafilmées jusqu'à leur gélification. Dans celui des pastilles, les puits sont fermés à l'aide d'un couvercle global et parafilmé. Après gélification, les bouchons ou couvercles, sont retirés et remplacés par du film adhésif microporeux (Dominique Dutscher AB0718).

Le séchage se termine lorsque tout le solvant est évaporé. Un suivi de la masse par pesées a été mis en place pour identifier ce terme. Cette méthode, qui consiste à peser chaque jour les lots de xérogels jusqu'à une masse stable, est fastidieuse. Or nous avons remarqué que l'obtention d'une masse stable correspond à une rétractation du volume de moitié, dans les trois dimensions[3]. Nous avons donc privilégié l'observation visuelle pour déterminer la fin du séchage. La rétractation dépend de la quantité de solvant initiale. Le critère d'un rétreint volumique de moitié est donc valable uniquement pour les formulations TMOS dans les ratios proposés.

A.1.2 Protocoles de détermination des limites de détections de l'indole et le 2-nitrophénol

Afin de déterminer les limites de détection des capteurs contenant différents précurseurs fonctionnalisés, ceux-ci sont exposés à une solution aqueuse d'indole ou de 2-

1. Avant usage, les plaquettes doivent être fonctionnalisées par un dépôt de silane fluoré. Entre chaque synthèse, les cuves sont nettoyées et re-fonctionnalisées tous les dix cycles.

nitrophénol.

Pour obtenir 100 ppb d'indole, 7 mL d'une solution à $2{,}5.10^{-3}$ mol.L^{-1} d'indole ($H_{cc}^{max} = 5{,}63.10^{-3}$ / $H_{cc}^{min} = 2{,}11.10^{-5)}$) sont placés dans un flacon de 15 mL. De même pour obtenir 100 ppb de 2-Nitrophénol, 7 mL d'une solution à 5.10^{-4} mol.L^{-1} de 2-Nitrophénol ($H_{cc}^{max} = 6{,}51.10^{-4}$ / $H_{cc}^{min} = 5{,}06.10^{-4)}$) sont placés dans un flacon de 15 mL. Un support composé d'une collerette métallique et de papier l'aluminium percé permet de placer le xérogel au-dessus du liquide (Figure A.1).

Les xérogels sont caractérisés après différents temps d'exposition pour déterminer le temps minimal d'exposition permettant la détection.

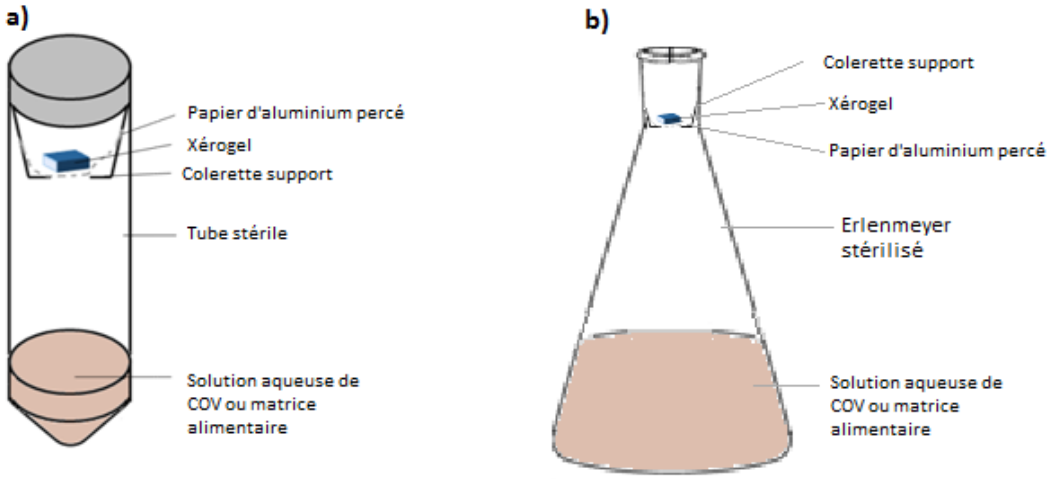


Fig. A.1 – **Montage d'exposition des xérogels :** a) en tube (15 mL ou 50 mL) b) erlenmeyer (250 mL)

.

Dans les chapitres suivants, le montage a été utilisé pour réaliser des expositions aux COV chimiques ou microbiens.

A.1.3 Etude des matrices nanoporeuses de silice par diffusion de rayons X aux petits angles (SAXS), adsorption-désorption azote et RMN du silicium

A.1.3.1 Courbes de diffusion des différents échantillons issues des analyses SAXS

Les figures présentent les différentes courbes de diffusion.

Etude de l'homogénéité d'un xérogel en différents points

La figure A.4 montre que les xérogels TMOS, le signal obtenu en position P1 et différent des signaux obtenus aux points P2 et P3, par ailleurs similaires entre eux. L'organisation du réseau sol-gel des formulations TMOS n'est donc pas homogène sur l'ensemble du monolithe. Le ménisque correspond à une zone particulière.

A l'inverse, la figure A.3 montre que le signal de diffusion ne dépend pas de la position de la mesure. Un xérogel TEOS apparait donc comme un matériau homogène.

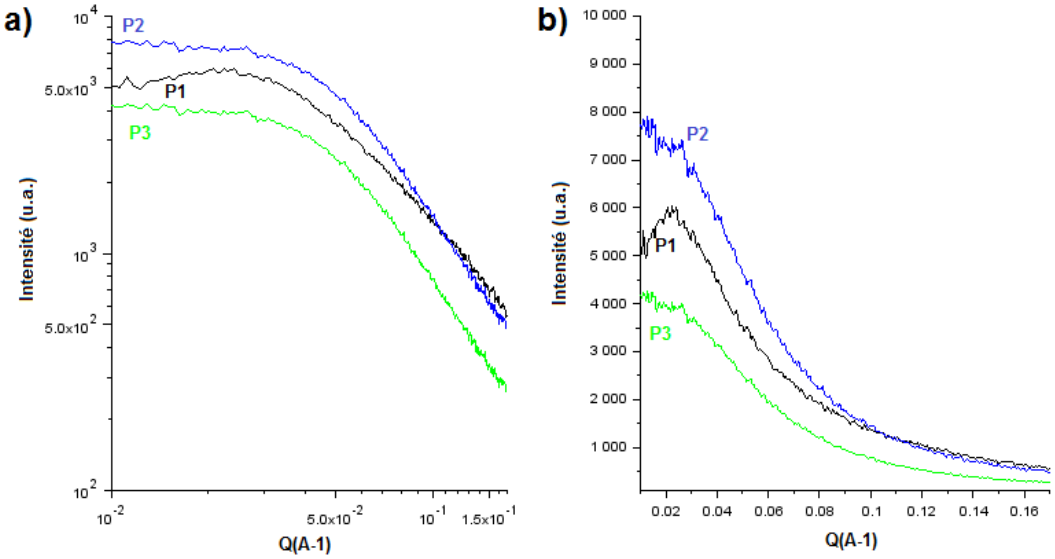


Fig. A.2 – **Matrice TMOS en différents points :** le point P1 près du ménisque se distingue des deux autres points de mesure P2 et 3

.

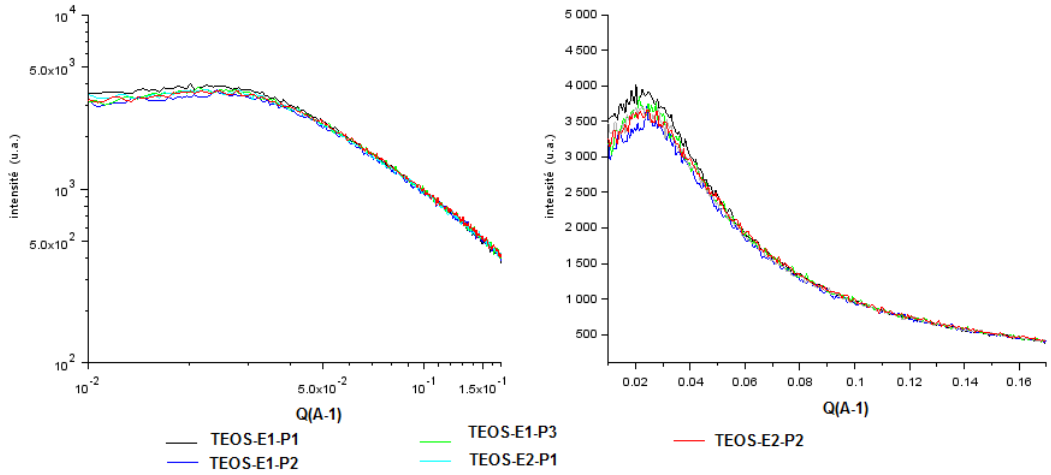


Fig. A.3 – **Matrice TEOS en différents points : Les trois points de mesure (ménisque, cœur et pied du monolithe) conduisent à des pentes de l'ordre de Q^{-2}**

TMOS/ABTES

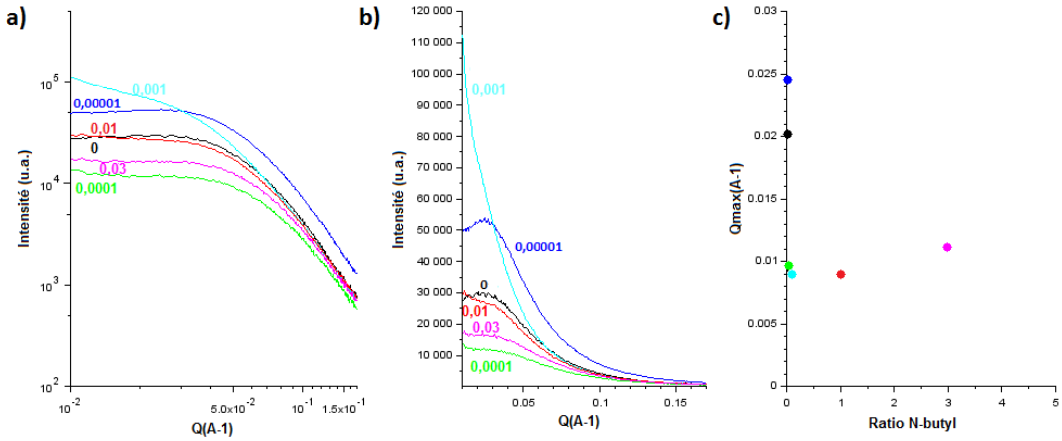


Fig. A.4 – **Gammes de xérogels TMOS/ABTES$_{1/X}$ au point de mesure P2 (cœur du matériau).** X est le ratio molaire d'ABTES. Il varie de 0 à 0,03.

.

La figure A.4 montre les spectres de diffusion aux petits angles d'une gammes de xérogels TMOS/ABTES$_{1/X}$ au point de mesure P2 (cœur du matériau). L'ensemble des spectres présente des pentes en Q^{-4} correspondant à des interfaces biens définies. Le ratio molaire d'ABTES, noté X, varie de 0 à 0,03. Le ratio d'ABTES influence l'intensité de diffusion.

TEOS/ABTES

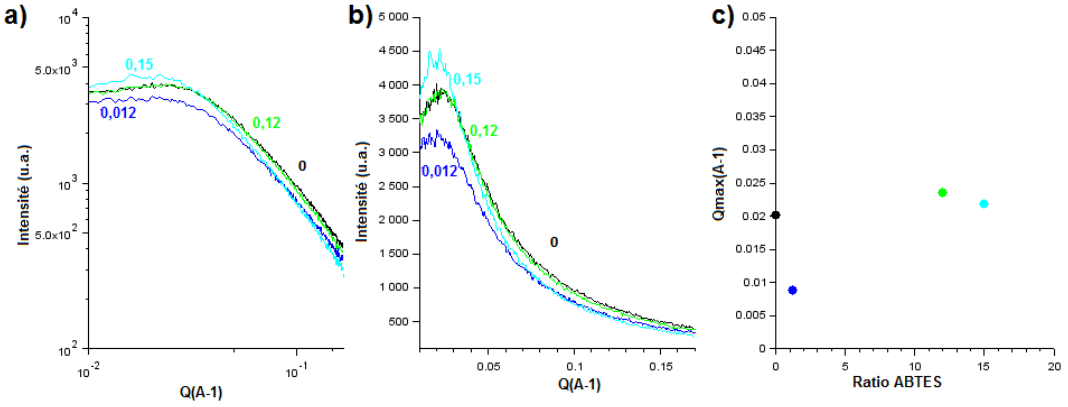


Fig. A.5 – **Matrice TEOS/ABTES pour différentes quantité de précurseur fonctionnalisé.**

.

TEOS/n-butyl

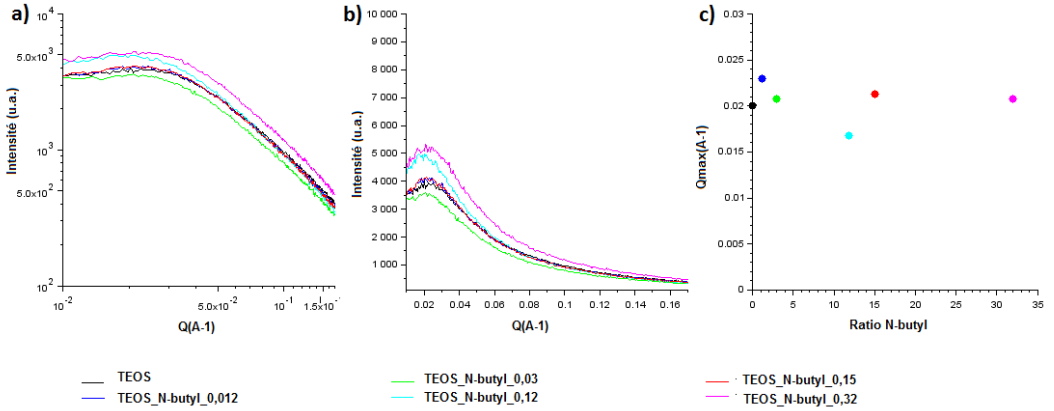


Fig. A.6 – **Matrice TEOS/n-butyl pour différentes quantité de précurseur fonctionnalisé.**

.

Les figures A.5 et A.6 montrent que l'ajout de précurseurs fonctionnalisés ABTES ou n-butyl, au sein de formulation TEOS, a peu d'influence sur les courbes de diffusions et donc sur la structure du matériau.

A.1.3.2 Distribution de taille de pores d'une gamme TMOS/ABTES séchés sous hotte

La figure A.7 montre l'évolution de la répartition de la taille des pores en fonction de la quantité d'ABTES au sein de xérogels TMOS. Les xérogels TMOS présentent majoritairement des pores compris entre 50 et 100 Å. Plus la quantité d'ABTES est augmentée moins cette gamme de taille de pores est représentative de l'échantillon. Les xérogels TMOS/ABTES$_{1/0,15}$ présentent ainsi des pores allant de 15 à 70 Å.

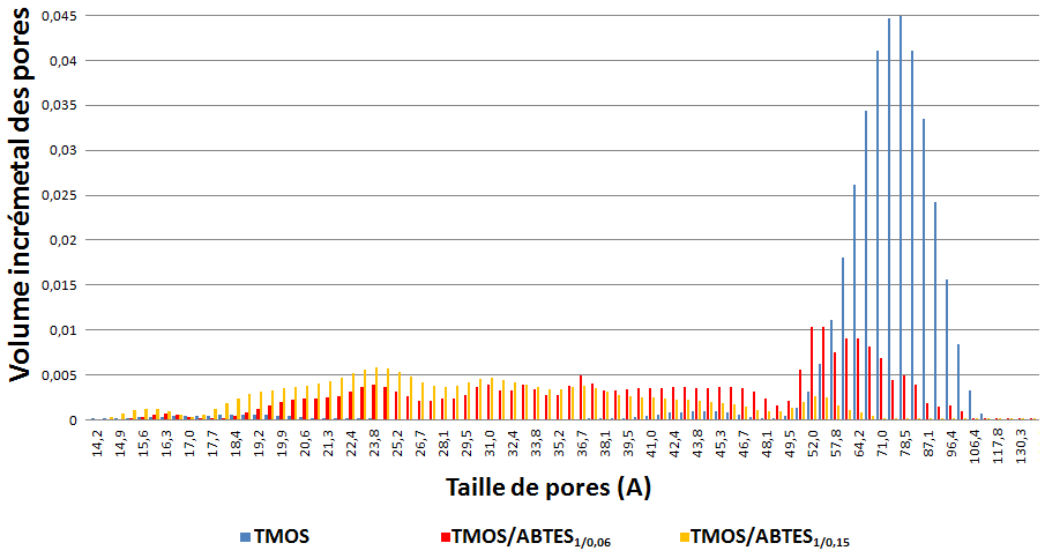


Fig. A.7 – **Distribution de taille de pores d'une gamme de monolithes TMOS/ABTES pour plusieurs ratio d'ABTES.** En l'abscence d'ABTES les pores sont compris entre 50 et 10 Å. La présence d'ABTES permet, dans ce cas, d'obtenir des pores de la dizaine à la centaine d'Ångstrom. Les mesures ont été réalisées *via* l'adsorption-désorption azote et la méthode DFT

A.1.3.3 Analyse structurale par RMN du silicium-29 de trois formulations de xérogels

La RMN du silicium-29 (RMN^{29}Si) permet d'analyser la structure des xérogels. En particulier de repérer les ponts siloxanes et la nature des silanols (Figure A.8). Par ailleurs la RMN^{29}Si évalue le taux de condensation du matériaux. Plus celui-ci est élevé plus la réaction de condensation est complète et plus l'état du matériaux sera stable dans le temps.

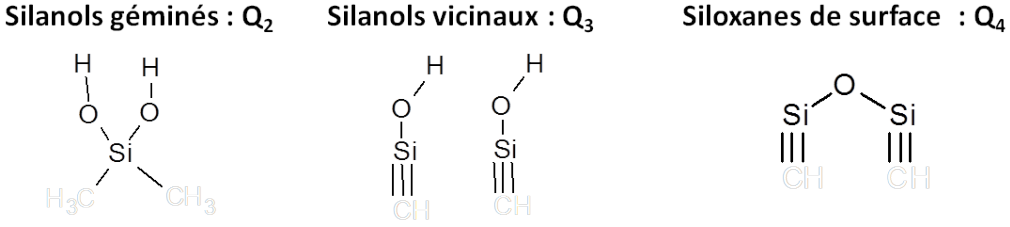


Fig. A.8 – **Ponts siloxanes Si-O-Si et groupements silanols Si-OH**

La figure A.9 compare des formulations TMOS et TEOS sans précurseur fonctionnel séchées à température ambiante. Pour les deux précurseurs les silanols sont majoritairement sous forme vicinale (Q_3). Le ratio de ponts siloxanes est plus faible dans le cas du TEOS que dans le cas du TMOS. Ce qui implique un taux de condensation plus important pour le TMOS (0,86) que pour le TEOS (0,83).

La figure A.10 montre l'influence de l'ajout d'ABTES sur la structure. Par comparaison avec la figure A.9-a), il est possible d'attribuer les pics dus à la présence d'ABTES (T_2 et T_3). Les molécules d'ABTES ont principalement pris une forme de pont siloxane (taux de condensation de 0,94), alors qu'au sein de la même formulation le précurseur TMOS donne majoritairement lieu à des silanols vicinaux (taux de condensation de 0,86).

Les taux de condensation des différents matériaux sont inférieurs à 0,95, il est donc probable que les xérogels évoluent au cours du temps. Des caractérisations postérieurs, menées lors du stockage dans différents conditions, permettront d'évaluer l'évolution du taux de condensation des matériaux au cours du temps d'une part, et l'impact de cette modification du réseau sol-gel sur la détection de COV d'autre part.

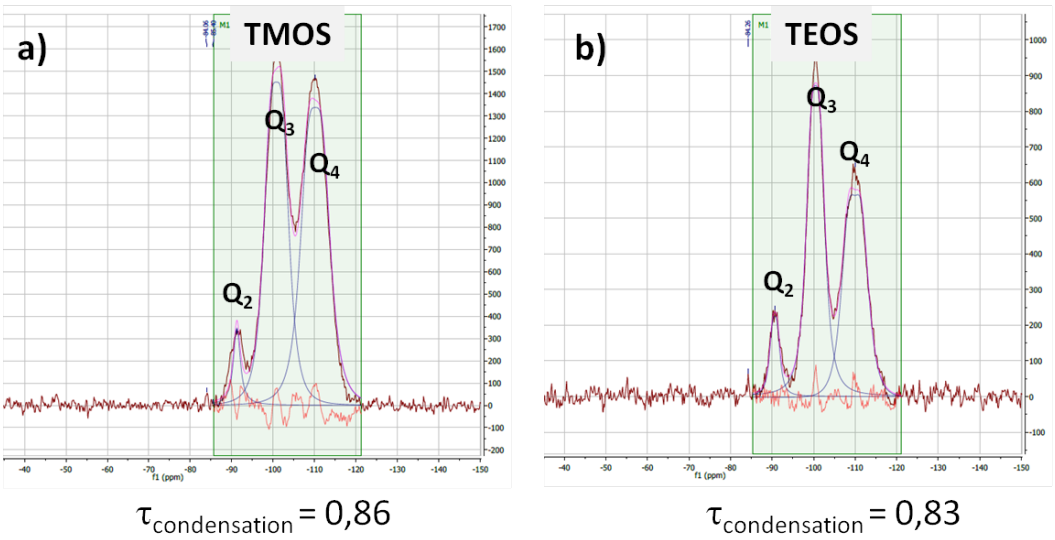


Fig. A.9 – **Analyse structurale par RMN du silicium-29** a) Formulation TMOS b) Formulation TEOS

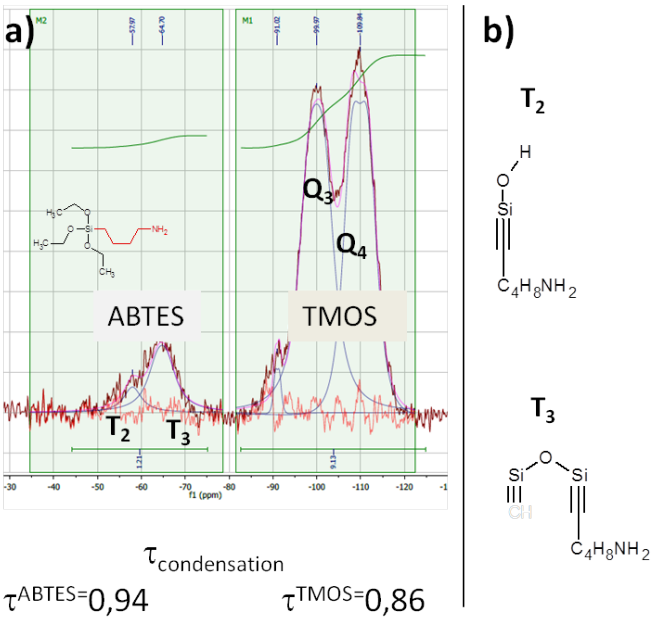


Fig. A.10 – **Analyse structurale par RMN du silicium-29** a) Formulation TMOS/ABTES$_{1/0,03}$ b) Forme prise par le précurseur fonctionnel, ABTES, au sein du réseau condensé

A.1.4 Xérogels TEOS-DTNB pour la capture de composés volatils soufrés

A.1.4.1 Protocole de synthèse des xérogels DTNB

Selon le catalyseur employé, l'étape de synthèse a été ajustée. Les étapes de mise en forme, gélification et séchage, sont par contre communes. Les ratios molaires des différentes formulations sont détaillés dans le tableau A.1.

Formulation n°1 : catalyseur NaOH avec co-solvant. L'éthanol contenant le DTNB en solution, le TEOS et l'eau MilliQ sont pré-hydrolysés sous agitation 2 h à 45°C puis 2 h à température ambiante. Le ballon de réaction est alors placé dans un bain à -20°C (éthanol - azote liquide). L'ABTES est alors ajouté. Après 10 min d'agitation supplémentaires le NaOH est introduit. La mise en forme doit avoir lieu rapidement, la gélification intervenant en moins de 10 min.

Formulation n°2 : catalyseur NH_4OH et acide acétique avec co-solvant. L'éthanol contenant le DTNB en solution, le TEOS et l'eau MilliQ sont pré-hydrolysés sous agitation 2 h à 45°C puis 2 h à température ambiante. Le ballon de réaction est alors placé dans un bain de glace. L'ABTES est alors ajouté. Après 10 min d'agitation supplémentaires le catalyseur est introduit.

Formulation n°3 : Acide acétique avec un très faible volume de co-solvant. Le TEOS et l'eau MilliQ ainsi que l'acide citrique sont pré-hydrolysés sous agitation 2 h à 45°C puis 2 h à température ambiante. Une solution éthanolique de DTNB à 0,2 mol.L^{-1} est alors ajoutée au sol (le rapport volumique entre le sol et la solution éthanolique est de 21). La solution ainsi obtenue est homogénéisée.

Formulation n°4 : Acide acétique avec un très faible volume de co-solvant et ajout de triéthylphosphate (TEP.) Le TEOS, le TEP et l'eau MilliQ ainsi que l'acide citrique sont pré-hydrolysé sous agitation 2 h à 45°C puis 2 h à température ambiante. Une solution éthanolique de DTNB à 0,2 mol.L^{-1} est alors ajouté au sol (le rapport volumique entre le sol et la solution éthanolique est de 21). La solution ainsi obtenue est homogénéisée.

Mise en forme, Gélification et Séchage : Les moules sont des cuves en polystyrène (EVERGREEN Spectrovettes semi micro, 201-3111) ou des cuves en quartz. Pour obtenir des monolithes de 2 mm d'épaisseur, 1 mL de sol est introduit dans chaque cuve. En effet, au cours du procédé, un rétreint est observé dans les trois dimensions. Il est également possible de synthétiser des xérogels de 800 µm d'épaisseur. Pour cela, trois plaquettes de silicium [2] de 0,74 mm d'épaisseur sont préalablement introduites dans les cuves, puis 300 µL de solution sont introduits dans la cuve. Il est nécessaire de verser doucement pour éviter la formation des bulles mais suffisamment rapidement pour éviter une gélification dans le cône de la pipette. Régulièrement des bulles sont piégées dans le gel. Pour obtenir une homogénéité optique[2], il convient de les extraire par une action mécanique avant gélification.

Le séchage est effectué en étuve 50°C. Les cuves sont fermées par un bouchon et parafilmées jusqu'à leur gélification. Par la suite les bouchons sont retirés et remplacés par du film adhésif microporeux (Dominique Dutscher AB0718).

A.1.4.2 Détection de CVS *via* des formulations TEOS

La réactivité des xérogels de différentes formulations TEOS-DTNB a été testée vis-à-vis de deux composés soufrés. L'éthanethiol étant un liquide, les xérogels ont été directement exposés à ses vapeurs selon le montage d'exposition en tube (p. 169). La concentration en phase gazeuse est calculée directement *via* la constante de Henry. Les valeurs adimensionnelles données dans la littérature sont comprises entre 5,38 et 8,81. La génération de l'H_2S s'effectue selon le protocole décrit ci-après.

Génération de l'H_2S

2. Avant usage, les plaquettes doivent être fonctionnalisées par un dépôt de silane fluoré. Entre chaque synthèse, les cuves sont nettoyées et re-fonctionnalisées tous les dix cycles.

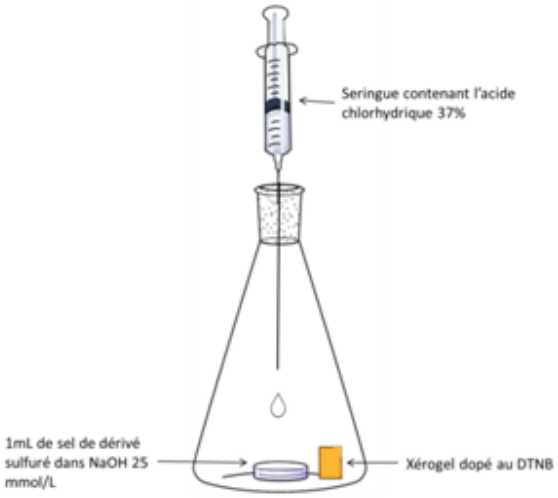


Fig. A.11 – Montage pour la génération de H_2S à partir de Na_2S

Le sulfure d'hydrogène est généré par addition d'acide chlorhydrique concentré sur une solution de sel de dérivés sulfurés (Na_2S). [7] La faible solubilité dans l'eau permet à une fraction importante de migrer en phase gazeuse.

Les récipients d'exposition sont des erlenmeyers de 100 mL à large col (figure A.11). Un bouchon à jupe permet d'une part l'étanchéité et d'autre par l'introduction de HCl. Un second récipient contenant 1 mL de solution de sel Na_2S dans NaOH 25.10^{-3} mol.L^{-1} est placé dans le fond de l'erlenmeyer. Un barreau aimanté assure son homogénéité. Le xérogel dopé au DTNB est placé à côté. L'acide chlorhydrique est introduit à l'aide d'une seringue à travers le septum.

La quantité d'H_2S généré dans le milieu est contrôlée par la quantité d'acide chlorhydrique introduite dans le milieu.

La loi de Henry exprime qu'en phase aqueuse : $H_{cc}(x)=\dfrac{C_G^{eq}(x)}{C_L^{eq}(x)}$

Or, une concentration en ppm correspond à une concentration en phase gazeuse de Cgaz en mol.L^{-1} selon la formule :

$C_G^{eq}(x)=\dfrac{n.10^{-6}}{\overline{V_M}(x)}$

$\Rightarrow C_{aq}(x)= C_{aq}^{i}(x).\ H_{cc}(x) \Rightarrow C_{aq}(x)=\dfrac{n.10^{-6}}{\overline{V_M}(x)}.\ H_{cc}(x)$

Quantité de Na_2S en solution aqueuse : La quantité de matière totale nécessaire à l'état initial pour atteindre l'équilibre souhaité est la somme des quantités de matière à l'équilibre en phase aqueuse et en phase gazeuse :

$n^{tot}(x)=n_G^i(x)+n_L^i(x)=n_G^{eq}(x)+n_L^{eq}(x)$

$\Rightarrow n^{tot}(x) = \dfrac{n.10^{-6}}{\overline{V_M}(x)}\ .(H_{cc}(x)\ V_{aq}+\ V_G)$

Il en résulte la quantité de Na_2S à introduire dans la phase aqueuse à l'état initiale :

$$C_{aq}(Na_2S) = \frac{n.10^{-6}}{\overline{V_M}(x)} .V_{aq}(H_{cc}(x)\ V_{aq} + V_G)))$$

$\overline{V_M}$ = 24 L.mol^{-1} à 20°C et 1 atm.

Pour que Na_2S soit sous forme ionique, le pH de la solution aqueuse doit être supérieur au pKa de Na_2S soit 7. La solution contient 25 mmol.L^{-1} de NaOH.

Quantité de HCl à introduire pour protoner Na_2S : Pour protoner Na_2S, il faut au minimum neutraliser NaOH. Ici dix fois plus d'acide chlorhydrique (à 37% ou 12,1 L.mol^{-1}) est introduit soit : $V_{HCl} = 10.\frac{(25.10^{-3} + C_{aq}).V_{aq}}{12,1}$

Réactivité des capteurs vis-à-vis des deux CVS

La réactivité des capteurs TEOS-DTNB a été testée vis-à-vis de deux VSC cibles : le sulfure d'hydrogène et l'éthanethiol. Le tableau A.1 regroupe les formulations testées ainsi que les limites de détection obtenues.

		Composition - Ratio Molaire							$\%^{P}_{Meca}$	H_2S		Ethanethiol	
	Réf.	TEOS	EtOH	H_2O	ABTES	DTNB	Catalyseur	TEP		ppm	t_D	ppm	t_D
NaOH	E3-A	1	5	4	0,03	0,004	3.10^{-1}	/	3	Non déterminé*			
	E3-B	1	5	4	0,03	0,004	3.10^{-3}	/	5				
	E3-C	1	5	4	0,03	0,004	3.10^{-1}	/	5				
	E3-D	1	5	4	0,03	0,004	3.10^{-3}	/	2				
NH_4OH	E4-A	1	5	4	0,03	0,004	3.10^{-1}	/	90	Non déterminé**			
	E4-B	1	5	4	0,03	0,004	3.10^{-2}	/	75				
	E4-C	1	5	4	0,03	0,004	3.10^{-3}	/	30	400	1h	400	3h
	E4-D	1	5	4	0,03	0,004	3.10^{-4}	/	29	300	1h	400	3h
AC	E6-A	1	5	4	0,03	0,004	3.10^{-1}	/	2	200	1h	500	8h
	E6-B	1	5	4	0,03	0,004	3.10^{-2}	/	6	200	1h	500	8h
	E6-C	1	5	4	0,03	0,004	3.10^{-3}	/	5	200	1h	500	4h
	E6-D	1	5	4	0,03	0,004	3.10^{-4}	/	0	300	1h	500	6h
	E6-E	1	/	4	0,03	0,004	3.10^{-3}	/	2	200	1h	500	3h
	E6-F	1	/	8	0,03	0,004	8.10^{-3}	0,6	3	100	1h	500	3h
	E6-G	1	/	11	0,03	0,004	8.10^{-3}	0,6	4	50	1h	200	2h

Tab. A.1 – Ensemble des formulations TEOS testées pour la détection des CSV et leurs limites de détection.* La rupture spontanée du pont à l'environnement basique ne peut être distinguée de la rupture liée à la présence des COV cibles ; ** Lorsque le pourcentage de perte mécanique était trop important les formulations n'ont pas été retenues et leurs limites de détection n'ont pas été déterminées.

A.2 Chapitre III

Formulation TMOS avec des molécules sondes solubles dans le méthanol

La synthèse des xérogels contenant des molécules sondes se déroule comme la formulation TMOS classique. L'incorporation des molécules sondes solubles se fait *via* la phase alcoolique. Plusieurs concentrations ont été testées pour chaque molécule sonde. Moduler la nature et la quantité, le précurseur fonctionnalisé permet de contrôler la forme sous laquelle se trouve les molécules sondes au sein du xérogels. Pour les formulations contenant de l'APTES, la synthèse s'effectue à -20°C (bain éthanol, azote liquide).

Cas particulier de l'inclusion de la porphyrine

A.2.1 Mise en place de formulation pour la fluorescence

A.2.1.1 Paramètres influençant la fluorescence intrinsèque

Le tableau A.2 regroupe les différents paramètres pouvant jouer sur la fluorescence intrinsèque des xérogels.

Aléatoire	*Environnement*	Salle blanche	Laboratoire de chimie
	Contenant	Cuves en verre silanisées [3]	Cuves en polystyrène
Contrôlé	*Protocole*	Sans pré-hydrolyse	Avec pré-hydrolyse

Tab. A.2 – Paramètres de synthèse

A.2.1.2 Récapitulatif des formulations testées en fluorescence

Six conditions de synthèse ont été testées (Tableau A.3). Tous les séchages ont eu lieu en étuve à 45°C.

	Alléatoires		**Contrôle**
Conditions	*Environnement*	*Contenant*	*Protocole*
n°1	Laboratoire de Chimie	Cuves en polystyrène	n°1 (Sans pré-hydrolyse)
n°2	Laboratoire de Chimie	Cuves en verre silanisées	n°1 (Sans pré-hydrolyse)
n°3	Salle blanche	Cuves en polystyrène	n°1 (Sans pré-hydrolyse)
n°4	Salle blanche	Cuves en verre silanisées	n°1 (Sans pré-hydrolyse)
n°5	Salle blanche	Cuves en polystyrène	n°2 (Avec pré-hydrolyse)
n°6	Salle blanche	Cuves en verre silanisées	n°2 (Avec pré-hydrolyse)

Tab. A.3 – Conditions de synthèse

Le tableau A.4 compare les résultats pour l'ensemble des formulations et protocoles testés en fluorescence. Les pourcentages de perte $\%^P_{Meca}$ et $\%^P_{Fluo}$ évaluent respectivement le pourcentage de xérogels écartés pour des raisons de propriétés mécaniques dégradées et de fluorescence intrinsèque. Les xérogels inutilisables en fluorescence présentent néanmoins de bonnes propriétés pour de la spectroscopie d'absorbance. Les meilleurs résultats sont indiqués en vert, tandis que les résultats acceptables sont indiqués en bleu.

	Composition - Ratio Molaire										Conditions de synthèse	Epaisseur	t_G	t_S	$\%^P_{Meca}$	$\%^P_{Fluo}$
Réf.	TMOS	TEOS	MeOH	EtOH	H_2O	HCl	AC	TEP	ABTES	n-butyl						
S61-A	1	/	5	/	4	/	/	/	0,15	/	2	2 mm	< 1 mn	48 h	0	100
S61-B	1	/	5	/	4	/	/	/	0,15	/	4	2 mm	<1 mn	48h	5	75
S64	1	/	5	/	4	/	/	/	0,15	/	4	800 µm	<1 mn	48h	0	65
S68	1	/	5	/	4	/	/	/	0,01	/	3	2 mm	<1 mn	48h	0	79
S69	1	/	5	/	4	/	/	/	0,01	/	3	800 µm	<5 mn	48h	6	68
S70	1	/	5	/	4	/	/	/	0,001	/	3	800 µm	<10 mn	48h	5	75
S73	1	/	5	/	4	/	/	/	0,001	/	3	800 µm	<10 mn	48h	10	70
S75	1	/	5	/	4	/	/	/	0,01	/	4	800 µm	<5 mn	48h	0	63
S76	1	/	5	/	4	/	/	/	/	0,1	4	800 µm	1 Jour	1 Semaine	13	88
S77	1	/	5	/	4	/	/	/	/	0,01	4	800 µm	1 Jour	1 Semaine	0	88
S86	/	1	/	5	4	/	/	/	0,04	/	1	800 µm	3 Jours	2 Semaines	17	90
S87	/	1	/	1,4	11	/	8	0,6	0,016	/	5	800 µm	1 Jour	1 Semaine	0	100
S93	/	1	/	/	11	/	/	/	/	0,01	5	800 µm	2 Jours h	2 Semaines	22	84
S94	/	1	/	3,5	11	/	/	/	/	0,01	5	800 µm	2 Jours	2 Semaines	10	87
S97	/	1	/	3,5	11	/	/	/	0,01		5	800 µm	< 6 h	2 Semaines	0	84
S97	/	1	/	3,5	11	/	/	/	0,01		5	800 µm	< 6 h	2 Semaines	0	84
S115-A	/	1	/	3,5	11	/	/	/	0,15		5	800 µm	< 6 h	1 Semaine	7	33
S115-B	/	1	/	3,5	11	/	/	/	0,15		6	800 µm	< 6 h	1 Semaine	0	0
S116	/	1	/	3,5	11	/	/	/	0,03		5	800 µm	1J h	1 Semaine	3	41
S117	/	1	/	3,5	11	/	/	/	0,001		5	800 µm	3J h	2 Semaines	19	58
S118-A	/	1	/	3,5	11	/	/	/	0,12		5	800 µm	< 6 h	1 Semaine	3	30
S118-B	/	1	/	3,5	11	/	/	/	0,12		6	800 µm	< 6 h	1 Semaine	0	0

Tab. A.4 – Ensemble des formulations testées en fluorescence

A.2.2 Préparation des suspensions bactériennes

La figure A.12 représente la préparation d'une suspension bactérienne. Le premier tube contenant du diluant pharmaceutique est ensemencé avec des colonies ayant moins de 24h (incubateur 37° C). Une densité optique (DO) de 0,5 McF [4] (mesuré par Densicheck, Biomérieux) correspond à une concentration d'environ 10^8 ufc.mL^{-1}. La dilution est réalisée au 10^{eme} dans des tubes de diluant pharmaceutique jusqu'à la valeur souhaitée pour inoculer l'échantillon.

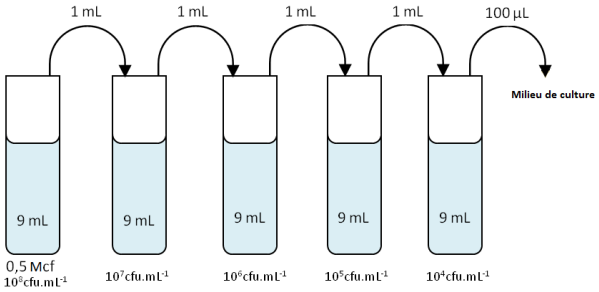


Fig. A.12 – Préparation de suspensions bactériennes par dilutions successives

A.3 Chapitre IV

A.3.1 Détection d'un COV endogène d'*E.coli* : l'indole

A.3.1.1 Détection de l'indole avec sonde spécifique

Cas des xérogels dopés DMACA avec catalyse acide

Le DMACA est introduit *via* une solution méthanolique. Pour les formulations contenant de l'APTES ou HCl, la synthèse s'effectue à -20°C (bain éthanol, azote liquide) pour les autres formulations, la synthèse s'effectue à température ambiante.

Les ratios molaires utilisés pour chaque formulation sont détaillés dans le tableau A.5. Lorsque l'étape de séchage sous hotte à température ambiante est terminée (la masse et le volume du xérogel sont stables), le xérogel est sec et peut être stocké à -20°C, afin de conserver au mieux la molécule de DMACA sous sa forme protonée.

4. En microbiologie, l'unité McFarland est utilisée comme référence pour ajuster la turbidité des suspensions bactériennes de sorte que le nombre de bactéries soit dans une gamme donnée pour normaliser les tests microbiens.

	TMOS	APTES	n-butyl	MeOH	DMACA	HCl 12M	TFA	H_2O	PSS
DMACA-HCl-1 [1]	0,97	0,03	/	5,0	3,40	140	/	4	/
DMACA-HCl-2 [2]	0,97	0,03	/	5,2	0,01	5	/	4	/
D-TFA-ABTES-1	1	0,03	/	5	3,4	/	0,15	4	/
D-TFA-ABTES-2	1	0,03	/	5	0,01	/	0,15	4	/
D-TFA-n-butyl-1	1	/	0,03	5	3,4	/	0,15	4	/
D-TFA-n-butyl-2	1	/	0,03	5	0,01	/	0,15	4	/
D-TFA-n-butyl-3	1	/	0,03	5	0,01	/	0,5	4	/
D-TFA-n-butyl-4	2	/	0,03	5	0,01	/	1	4	/
D-TFA-n-butyl-5	3	/	0,03	5	0,01	/	1,5	4	/
D-TFA-n-butyl-6	4	/	0,03	5	0,01	/	2	4	/
D-TFA-n-butyl-7 (800 µm)	4	/	0,03	5	0,01	/	2	4	/
D-PSS1	1	/	0,03	5	0,01	/	/	4	0,01
D-PSS-2	1	/	0,03	5	0,01	/	/	4	0,1
D-PSS-3	1	/	0,03	5	0,01	/	/	13,9	1
D-PSS-4 (800 µm)	1	/	0,03	5	1	/	/	13,9	1

Tab. A.5 – Ratios molaires de réactifs pour la préparation des sols des xérogels dopés DMACA avec catalyse acide.

Remarque : Le ratio molaire de 140 pour HCl conduit à un volume de plus d'1 L. Soupçonnant une erreur de virgule, des xérogels ont été synthétisés avec dse ratios molaires en HCl de 14 et 1,4 conduisant respectivement au temps de gélification

A.3.1.2 Protocole de synthèse des xérogels TMOS DMACA

Le TEOS, la solution éthanolique de DMACA, et l'eau MilliQ sont pré-hydrolysés sous agitation 2 h à 45°C puis 2 h à température ambiante.

La n-butyl est alors ajouté et laissé sous agitation 10 min.

Le ballon de réaction est alors placé dans un bain à -20°C (éthanol - azote liquide) L'acide chlorhydrique est alors ajouté.

La mise en forme doit avoir lieu rapidement, la gélification intervenant en moins de 15 min.

Mise en forme, Gélification et Séchage

Les moules sont des cuves en polystyrène (EVERGREEN Spectrovettes semi micro, 201-3111) ou des cuves en quartz. Pour obtenir des monolithes de 2 mm d'épaisseur, 1 mL de sol est introduit dans chaque cuve. En effet, au cours du procédé, un rétreint est observé dans les trois dimensions. Il est également possible de synthétiser des xérogels de 800 µm d'épaisseur. Pour cela, trois plaquettes de silicium [5] de 0,74 mm d'épaisseur sont préalablement introduites dans les cuves, puis 300 µL de solution sont introduits dans la cuve. Il est nécessaire de verser doucement pour éviter la formation des bulles mais suffisamment rapidement pour éviter une gélification dans le cône de la pipette. Régulièrement, des bulles sont piégées dans le gel. Pour obtenir une homogénéité optique[2], il convient de les extraire par une action mécanique avant gélification.

A.3.1.3 Détection de l'indole en absorbance sans sonde

Détection en milieu gélosé. Les boîtes de Petri A-1 et A-2 sont ensemencées avec 100 μL d'une solution évaluée à 10^4 ufc.mL^{-1}. Sur les boîtes B-1 et B-2, 100 μL d'une solution aqueuse à 10^{-2} mol.L $^{-1}$ sont étalés. Enfin les boîtes C-1 et C-2 sont les témoins. Un xérogel de formulation TMOS-ABTES$_{0,03}$ est déposé au fond de toutes les boites qui sont incubées à 37°C. L'absorbance des xérogels est contrôlée régulièrement au fil du temps pendant 48 h.

Détection de l'indole chimique ou microbien dans l'EPT : Un flacon de 250 mL neuf d'EPT Biorad est réparti dans quatre flacons stériles de 83 mL. Ces quatre fractions sont nommées respectivement D, E, F et G (Figure A.13). Deux boîtes de comptage, selon la norme ISO 7218, sont alors effectuées par flacon. Il s'agit de contrôler la stérilité des milieux, qui est confirmée.

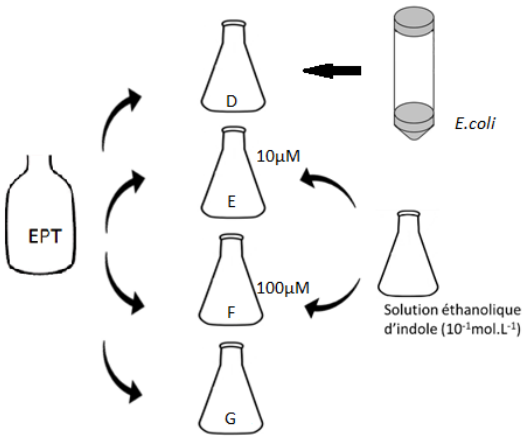


Fig. A.13 – Protocole de préparation du milieu EPT

5. Avant usage, les plaquettes doivent être fonctionnalisées par un dépôt de silane fluoré. Entre chaque synthèse, les cuves sont nettoyées et re-fonctionnalisées tous les dix cycles.

La fraction D est inoculée avec une suspension de *E.coli* afin d'obtenir 10^3 ufc.mL^{-1}, puis séparée en deux flacons, D-1,et D-2 . Un nouveau comptage est effectué pour chaque flacon pour contrôler la charge microbienne, qui est confirmée.

Une solution éthanolique à 10^{-1} mol.L^{-1} d'indole est préparée. 75 µL et75 µL de cette solution sont respectivement ajoutés aux fractions E et F pour obtenir des solutions respectivement à 10^{-3}mol.L^{-1} et 10^{-2}mol.L^{-1}. Deux concentrations d'indole sont testées. En effet, la solution la plus concentrée permet d'espérer une détection plus aisée.

Enfin, la fraction G est divisée en deux témoins.

L'ensemble des flacons est placé à l'incubateur à 37°C sous agitation. Des spectres d'absorbance sont ensuite réalisés.

Détection de l'indole chimique ou microbien dans matrice alimentaire : L'exposition s'effectue dans tubes stériles de 50 mL contenant 25 mL de liquide selon le montage présenté page 169.

275 mL d'EPT Biorad et 67,8 g de hachis Parmentier (la partie viande du hachis, *a priori* la plus contaminée, a particulièrement été ciblée lors du prélèvement) sont mélangés. Le rapport volume sur masse est de 8 [6]. Le sac est fermé et homogénéisé 4 min. Le jus ainsi obtenu est réparti, sous PSM, en quatre fractions de 130 mL, notées H, I, J et K. Le pipetage est rendu difficile par un dépôt blanc dans le sac d'homogénéisation qui bouche le filtre. Ce dépôt est attribué à la graisse dont la température de fusion est proche de 22 °C. Deux boîtes de comptage sont alors effectuées par flacon pour contrôler la stérilité. Les tests sur milieux chromogéniques révèlent la présence de coliformes dans la matrice, qui s'avère donc non stérile. Il sera nécessaire d'en tenir compte pour interpréter les résultats.

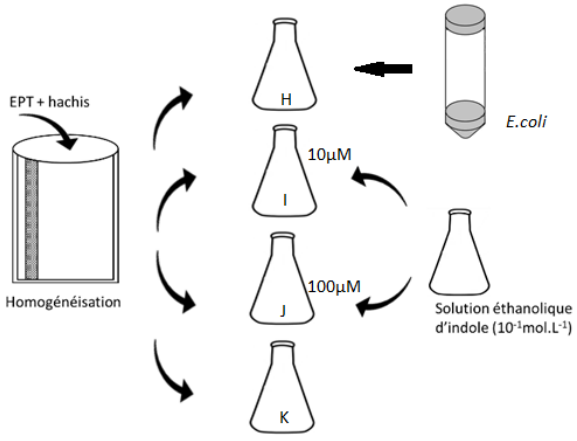


Fig. A.14 – Protocole de préparation du milieu EPT

La fraction H est inoculée avec une suspension de *E.coli* afin d'obtenir 10^3 ufc.mL^{-1},

6. Lors des contrôles en microbiologie industrielle agroalimentaire le rapport volume de liquide sur masse d'échantillon est de 10.

puis séparée en trois flacons, H-1 et H-2. Un nouveau comptage est effectué pour chaque flacon.

Une solution éthanolique à 10^{-1} mol.L^{-1} d'indole est préparée. 13 µL et 13 µL de cette solution sont respectivement ajoutés aux fractions I et J pour obtenir des solutions respectivement à 10^{-3}mol.L^{-1} et 10^{-2}mol.L^{-1}.

La fraction K constituera les témoins (K-1,K-2).

Après mise en place des xérogels, l'ensemble des tubes est placé dans un incubateur à 37°C sous agitation.

Le tableau A.6 regroupe l'ensemble des résultats. Pour les trois milieux (Gélose, EPT et matrice alimentaire) dans les trois conditions inoculations (*E.coli*, indole chimique et témoin), les duplicatas sont cohérents deux à deux. Une première série de comptage a été effectuée avant inoculation pour évaluer la stérilité des milieux. La matrice alimentaire apparait contaminée.

	Gélose						EPT								Alimentaire							
	E.coli		Indole		*Témoin		*E.coli*		Indole				Témoin		*E.coli*		Indole				Témoin	
	10^3 ufc.mL^{-1}		10^{-3}mol.L^{-1}				10^3 ufc.mL^{-1}		10^{-3}mol.L^{-1}		10^{-2}mol.L^{-1}				10^3 ufc.mL^{-1}		10^{-3}mol.L^{-1}		10^{-2}mol.L^{-1}			
Réf.	A1	A2	B1	B2	C1	C2	D1	D2	E1	E2	F1	F2	G1	G2	H1	H2	I1	I2	J1	J2	K1	K2
Comptage stérilité																						
ufc/boîte							0	0	0	0	0	0	0	0	12	13	8	9	9	12	15	12
ufc.mL^{-1}							0	0	0	0	0	0	0	0	1.10^2	1.10^2	8.10^1	9.10^1	9.10^1	1.10^2	2.10^2	1.10^2
Post-culture																						
ufc/boîte	250	245	0	0	0	0	235	251	0	0	0	0	0	0	423	421	326	336	389	412	419	406
ufc.mL^{-1}	3.10^3	2.10^3	0	0	0	0	2.10^3	3.10^3	0	0	0	0	0	0	4.10^3	4.10^3	3.10^3	3.10^3	4.10^3	4.10^3	4.10^3	4.10^3
Spectrométrie d'absorbance : présence d'un pic aux alentours de $\lambda_{max}^{indole} = 270$ nm																						
24 h	☑	☑	☑	☑	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☑	☑	☒	☒	☒	☒	☒	☒	☑	☑	☒	☒
48 h	☑	☑	☑	☑	☒	☒	☑	☑	☑	☑	☑	☑	☑	☑	☑	☑	☑	☑	☑	☑	☑	☑

Tab. A.6 – Récapitulatif des résultats obtenus pour la détection de l'indole en absorbance sans sonde dans trois matrices de complexités différentes (gélose, EPT et Hachi commercial). Pour chaque matrice, les xérogels ont été exposés à des échantillons témoins, de l'indole chimique et des cultures de *E.coli*

Récapitulatif des résultats : Les comptages servent respectivement à vérifier la stérilité des matrices biologiques, puis à évaluer la croissance bactérienne et le cas échéant la présence de contamination.

La détection de l'indole se fait par spectrométrie d'absorbance sans sonde. La présence d'un pic aux alentours de 270 nm est observée.

☑ : Présence d'un pic aux alentours de 270 nm

☒ : Absence de pic aux alentours de 270 nm

Dans le cas du milieu gélosé la distinction entre présence et absence d'indole correspond bien à la présence ou l'absence de pic. En cas de culture bactérienne, la détection d'indole est plus longue mais effective. Pour les deux autres milieux plus complexes un pic aux alentours de 270 nm est quasiment systématiquement visible. Il n'est alors pas possible de différentier les expérimentations mettant en jeu réellement de l'indole.

A.3.1.4 Détection en fluorescence sans sonde de l'indole

A.3.2 Détection de COV exogènes

A.3.2.1 Spécificité de l'activité enzymatique α-glucosidase

L'exposition à lieu dans des flacons de verre de 200 mL.

La prise d'essai en mayonnaise est 4 g pour 36 mL de liquide. La quantité de substrat est de 250 μmol.L^{-1}. La charge bactérienne est estimée à 10^2 ufc.mL^{-1}.

A.3.2.2 Spécificité de l'activité enzymatique C8-esterase

L'exposition a lieu dans des flacons de verre de 200 mL. La prise d'essai en mousse au chocolat est 4 g pour 36 mL de liquide. Ce rapport vise à se mettre dans les mêmes conditions que la norme d'analyse 25 g pour 225 mL.

Deux séries sont réalisées. La première série testera en parallèle dans les mêmes flacons les activités C8-Estérase et thiosulfate réductase, respectivement à l'aide de capteurs $ABTES_{12\%}$ et de capteurs DTNB. Tandis que, dans la seconde série seule l'activité C8-Estérase sera détectée.

L'activité C8-Estérase est mise en évidence *via* le substrat enzymatique 2-nitrophényl caprylate (C8-E-2NP). La quantité de substrat est de 250 μmol.L^{-1}. Le TWEEN20 est utilisé comme tensio-actif selon un rapport $\frac{TWEEN20}{C8-E-2NP}$=10 déterminé lors d'études préliminaires. [59] Ce rapport correspond à l'optimum d'un ensemble de conditions préalablement testées. La charge bactérienne est estimée à 10^2 ufc.mL^{-1}. L'activité thiosulfate réductase est endogène. La libération de l'H_2S peut être observée directement à partir des nutriments issus des matrices alimentaires. Cependant, pour augmenter la cinétique de détection, du $Na_2O_3S_2$ est ajouté au milieu à une concentration de 20 mmol.L^{-1}.

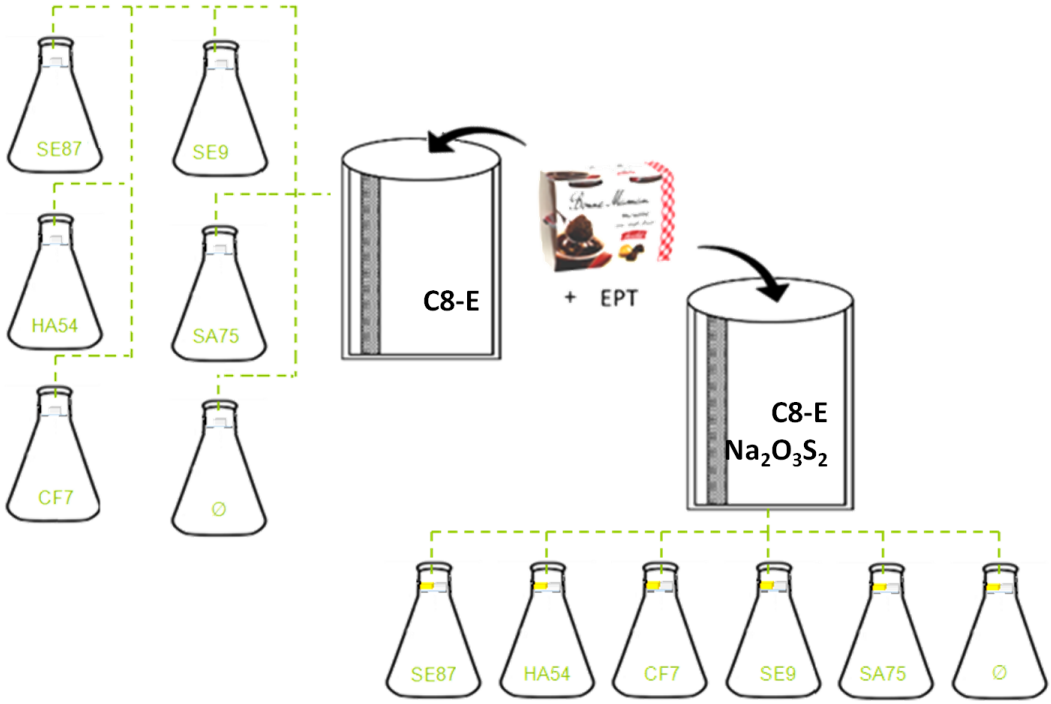


Fig. A.15 – Préparation des milieux chocolatés pour évaluer la spécificité des activités enzymatiques C8-Estérase et thiosulfate réductase.***SE87*** *: Salmonella enterica ;* ***HA54*** *: Hafnia alvei ;* ***CF7*** *: Citrobacter freundii ; SE9 : Staphylococcus epidermidis ;* ***SA75*** *: Staphylococcus aureus*

A.3.2.3 Détection de l'activité β-GAL par capture du 2-naphtol.

Préparations des différents milieux

Deux solutions de β-napthol ont été préparées, l'une aqueuse 2,5 mmol.L^{-1} pour l'exposition a), la seconde est hydroalcoolique à 25 mmol.L^{-1}, pour préparer les milieux b) et c).

Une solution de β-GAL-2-Nol à 5.10^{-2} mol.L^{-1} est préparée dans l'EPT. Ce substrat étant très peu soluble dans l'eau, un tensioactif, Tween20 (T_{20}), est employé pour le dissoudre avec un rapport de concentrations massiques de $\frac{T_{20}}{Substrat}$ de 8 qui correspond au ratio minimal permettant d'obtenir une solution translucide. La plus petite quantité possible de tensioactif doit être utilisée. En effet, ce dernier tend à diminuer la biodisponibilité du substrat. Un compromis doit donc être mis en œuvre pour avoir d'une part une bonne solubilité et d'autre part une accessibilité du substrat aux bactéries.

La mousse au chocolat employée est une mousse de la gamme "Bonne Maman" (voir référence en annexe).

Une prise d'essai de 10 g de mousse au chocolat est diluée dans 100 mL d'EPT dans un sac d'homogénéisation (le terme sac « stomacher » est couramment employé). Après

homogénéisation, le contenu du sachet est réparti en deux fractions de 50 mL. Un comptage par étalement sur boite de 100 μL du mélange d'EPT - mousse au chocolat permet de vérifier la stérilité.

Dans la fraction c), 5,55 mL de la solution de β-napthol à $2{,}5.10^{-2}$ mol.L^{-1} sont ajoutés.

Dans la fraction e), le mélange T_{20}/ β-GAL-2-Nol est introduit pour obtenir 5.10^{-2} mol.L^{-1} en β-GAL-2-Nol.

Enfin dans les flacons d) et e) 5 mL d'une suspension à 10^5 ufc.mL^{-1} est ajoutée. L'ensemble des flacons est placé à l'incubateur à 37°C. En raison de la forte charge bactérienne, les comptages sont effectués à partir d'une dilution par 100 de la solution.

La figure A.16 schématise la préparation des milieux décrite ci-dessus.

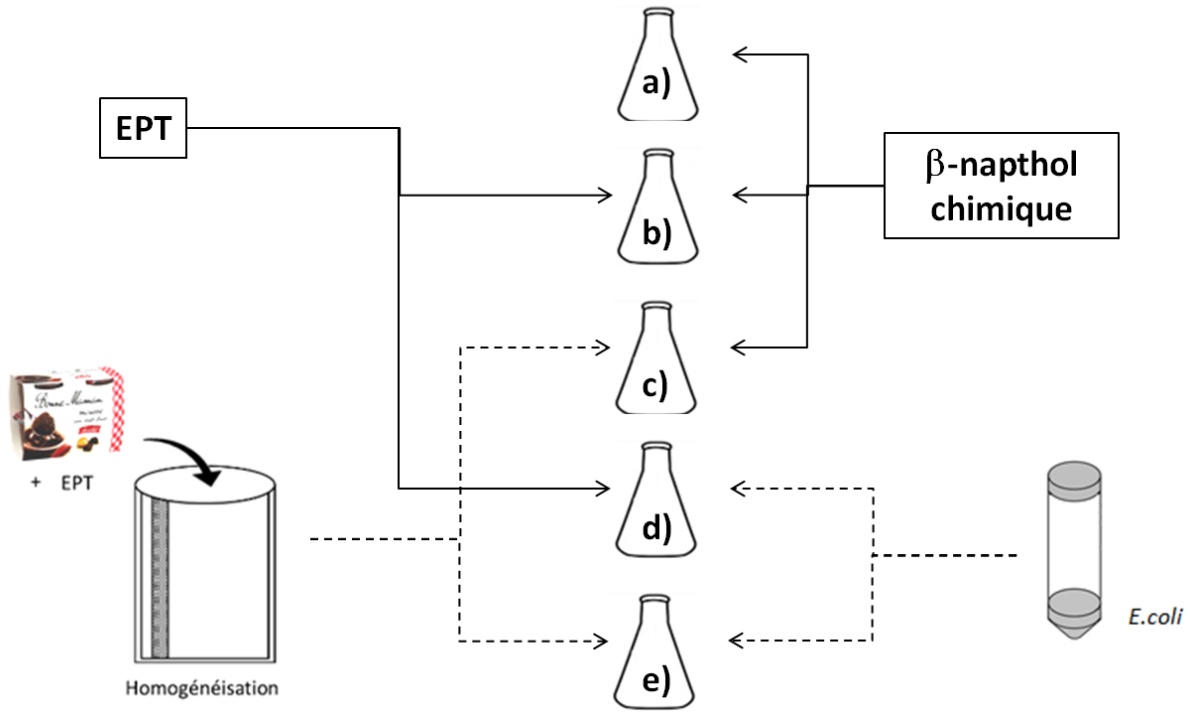


Fig. A.16 – **Protocole de préparation des milieux EPT.** L'échantillon **e** constitue notre expérimentation de référence, *E.coli* inoculée dans la matrice alimentaire. Les autres sont différents types de témoins. **a**) β-napthol chimique aqueux, **b**) β-napthol chimique dans de l'EPT, **c**) β-napthol chimique dans la matrice alimentaire, **d**) *E.coli* inoculée dans de l'EPT.

Le tableau A.7 présente les comptages sur boîtes effectuées pour vérifier la stérilité de la mousse au chocolat.

	Mousse au chocolat	Culture d)	Culture e)
ufc/boîte	0	265	302
ufc.mL^{-1}	0	3.10^{-3}	3.10^{-3}

Tab. A.7 – Comptages bactériennes des milieux de culture

A.3.3 Instrumentation d'un sac d'homogénéisation

Les cultures de travail sont effectuées la veille (croissance à 37°C - 16h). La matrice alimentaire testée se compose d'aiguillettes de poulet achetées sous vide en grande surface. Les morceaux de poulet sont découpés sous PSM à l'aide d'un couteau préalablement stérilisé à l'autoclave.

Préparation des milieux : Sous PSM, 207 mL d'EPT Biorad à 100 µmol.L^{-1} en substrat β-GUR-2-NP sont mélangés dans un sac Stomacher à 23,3 g de poulet. Le sac est fermé et homogénéisé 4 min. Un comptage sur boite est effectué. Sous PSM, 2,3 mL d'une suspension de *EC28* (0,5 McF diluée 3 fois par 10) sont incorporés. Le sac est fermé et homogénéisé 4 min. Un comptage sur boite est effectué. Sous PSM, 3 x 7 mL de jus sont prélevés et réservés dans des tubes de 15 mL. Dans le sac, à environ 5 cm du haut trois adhésifs stériles sont collés contre la paroi, puis trois filtres contenant les trois xérogels sont collés sur l'autre face du Gene Frame . Le montage est alors incubé à 37°C sous une agitation de rotation 70 rpm.

La préparation des échantillons inoculés *HA54* ainsi que des échantillons témoins suit un protocole similaire. Les quantités de viande et de substrat sont précisées dans le tableau A.8.

Échantillon	*EC28*	*HA54*	∅
m_{poulet} (g)	23,3	24,6	26,1
$V_{EPT+\beta-GUR-2-NP}$ (mL)	207	221,1	234,9
$V^{0,5McF-D3}_{Inoculation}$ (mL)	2,3	2,46	/

Tab. A.8 – Compositions des différents sacs d'exposition. Les trois sacs contiennent un rapport $\frac{m(g)}{V(mL)} \simeq 10$ ainsi qu'une concentration en substrat 100 µmol.L^{-1}.

Annexe B

Concentration en phase gazeuse

B.1 Loi et constante de Henry

La loi de Henry traduit la solubilité, à température donnée, d'un composé organique volatil hydrosoluble dans un liquide en équilibre avec le gaz lui même. La quantité de gaz présent dans le solvant est fonction de la pression partielle qu'exerce ce gaz sur ce dernier mais aussi de sa solubilité dans l'eau.

Bien qu'équivalentes , il existe plusieurs définissions de la constante de Henry, comme l'illustrent les équations (B.1, B.2 et B.3) ci-dessous.

$$k_H = \frac{c_l}{p_g} \qquad \text{(B.1)} \qquad k_{H^{CC}} = \frac{c_l}{c_g} = k_H.R.T \qquad \text{(B.2)} \qquad k_{H^{px}} = \frac{p_g}{x_l} \qquad \text{(B.3)}$$

— c_l : concentration de l'espèce en phase liquide
— p_g : pression partielle de l'espèce en phase gazeuse
— c_g : concentration de l'espèce de cette espèce en phase gazeuse
— R : constante des gaz parfaits
— T : température
— x_l : fraction molaire en phase liquide

Les différentes unités des constantes de Henry

Ces différentes définitions des constantes de Henry donnent lieu à l'expression de ces constantes selon différentes unités. La littérature n'est pas homogène. Ce manque d'uniformité implique un grand soin en cas de reprise et comparaison de données issues de la

littérature. Un important travail d'inventaire des constantes de Henry a été effectué par Sander. Ses publications traitent de façon détaillée de la conversion entre les différentes unités et les définitions des constantes de la loi de Henry. Dans le système internationale l'unité de référence est mol.Pa^{-1}.m^{-3}, cependant ce n'est pas la plus usitée. L'une des unités les plus employées est la mol.L^{-1}.atm^{-1} souvent abrégée par M.atm^{-1}. Les constantes de Henry sont également fréquemment utilisées sans unité. C'est cette convention qui a été retenue pour ces travaux de thèse. Le tableau B.1.

Les équations B.4 à B.8 exprime les conversions nécessaires pour obtenir une constante de Henry sans dimension à partir des différentes unités utilisées dans la littérature.

$$H_{cc} = \frac{H_{cc}^{atm.m3/mol}}{1,01.10^{-5}.RT} \tag{B.4}$$

$$H_{cc} = \frac{H_{cc}^{Pa.m3/mol}}{RT} \tag{B.5}$$

$$H_{cc} = \frac{H_{cc}^{atm.L/mol}}{10^{-3}RT} \tag{B.6}$$

$$H_{cc} = \frac{1}{H_{cc}^{mol/(Pa.m3)} * 1,01.10^{-2}RT} \tag{B.7}$$

$$H_{cc} = \frac{1}{H_{cc}^{mol/(Pa.m3)} * 1,01.10^{-2}RT} \tag{B.8}$$

Nom du composé	Structure du composé	Constante de Henry Hcc	Références
Méthanethiol	CH4S	1,23.10-1	[2]
		1,05.10-1	[3]
Sulfure d'hydrogène	H2S	4,09.10-1	[3]
4-nitrophénol	C6H5NO3	1,57.10-8	[3]
		4,13.10-5	[3]
		1,36.10-6	[3]
		5,11.10-7	[3]
2-nitrophénol	C6H5NO3	5,85.10-4	[3]
		5,53.10-4	[3]
		5,18.10-4	[3]
Indole	C8H7N	1,52.10-1	[5]
		2,16.10-5	[4]
		2,12E-05	[47]
		5,65E-05	[47]
		5,65E-05	[47]
		2,11E-05	[47]
		5,63E-03	[47]
		2,66E-03	[47]
		2,10E-03	[47]
		4,44E-03	[47]

Tab. B.1 – Constantes de Henry de quelques composés volatils d'intérêt pour la détections de pathogènes

B.2 Concentrations dans la phase gazeuse à l'équilibre

Pour la suite de ces démonstrations, n correspond à la quantité de matière, V au volume et C à la concentration. Les exposants *i*, *eq* et *tot* précisent si la variable est considérée dans

son état initial, dans son état d'équilibre ou pour la totalité du système. Les indices G et L indiquent s'il s'agit de la phase gazeuse ou de la phase liquide. x correspond à l'espèce chimique considérée. Enfin H_{CC} et $\overline{\mathrm{V_M}}$ correspondent respectivement à la constante de Henry et au volume molaire.

Quantités de matière initiales

$n^{tot}(x)$=$n^i_G(x)$+$n^i_L(x)$=$n^{eq}_G(x)$+$n^{eq}_L(x)$

or $n^i_G(x)$=0

$\Rightarrow n^i_L(x)$=$n^G_{eq}(x)$+$n^L_{eq}(x)$

Quantité de matière à l'équilibre en milieu liquide

$$H_{cc}(x)=\frac{C^{eq}_G(x)}{C^{eq}_L(x)}$$

$$\Rightarrow H_{cc}=\frac{C^G_{eq}}{C^L_{eq}}$$

$$\Rightarrow \frac{n^{eq}_G(x)}{V_G}=\frac{H_{cc}(x).n^{eq}_L(x)}{V_L}$$

$$\Rightarrow \frac{n^{tot}(x)-n^{eq}_L(x)}{V_G}=\frac{H_{cc}(x).n^{eq}_L(x)}{V_L}$$

$$\Rightarrow \frac{n^{tot}(x)}{V_G}=n^{eq}_L(x).(\frac{1}{V_G}+\frac{H_{cc}(x)}{V_L})=n^{eq}_L(x).\frac{V_L+H_{cc}(x).V_G}{V_G.V_L}$$

$$\Rightarrow n^L_{eq}(x)=\frac{n^{tot}(x)}{V_G}.\frac{V_G.V_L}{V_L+H_{cc}(x).V_G}$$

$$\Rightarrow n^L_{eq}(x)=\frac{n^{tot}(x).V_L}{V_L+H_{cc}(x).V_G}$$

$$\Rightarrow n^L_{eq}(x)=\frac{C^i_L(x).V_L.V_L}{V_L+H_{cc}(x).V_G}$$

$$\Rightarrow n^L_{eq}(x)=\frac{C^i_L(x).V^2_L}{V_L+H_{cc}(x).V_G}$$

Quantité de matière à l'équilibre en phase gazeuse

$n^{eq}_G(x)$=$n^{tot}(x)$-$n^{eq}_L(x)$

$$\Rightarrow n^{eq}_G(x)=n^{tot}(x)-\frac{n^{tot}(x).V_L}{V_L+H_{cc}(x).V_G}=n^{tot}(x).\ (1-\frac{V_L}{V_L+H_{cc}(x).V_G})$$

$$\Rightarrow n^{eq}_G(x)=C^i_L(x).V_L.\ \frac{V_L+H_{cc}(x).V_G-V_L}{V_L+H_{cc}(x).V_G}$$

$$\Rightarrow n^{eq}_G(x)=\ \frac{C^i_L(x).H_{cc}(x).V_G.V_L}{V_L+H_{cc}(x).V_G}$$

PPM en phase gazeuse

$$C_{eq}^{G}(x^{ppm}) = \overline{\mathrm{V_M}}(x)\ .\ C_{G}^{eq}(x)\ .\ 10^{6}$$

$$\frac{V_{eq}^{G}}{V_G}$$

$$\Rightarrow C_{eq}^{G}(x^{ppm}) = \overline{\mathrm{V_M}}(x)\ .\ \frac{n_{G}^{eq}(x)}{V_G}\ .\ 10^{6}$$

$$\Rightarrow C_{eq}^{G}(x^{ppm}) = \frac{\overline{\mathrm{V_M}}(x)}{V_G}\ \frac{C_{L}^{i}(x).H_{cc}(x).V_G.V_L}{V_L + H_{cc}(x).V_G}.\ 10^{6}$$

$$\Rightarrow C_{eq}^{G}(x^{ppm}) = \frac{\overline{\mathrm{V_M}}(x).C_{L}^{i}(x).H_{cc}(x).V_L}{V_L + H_{cc}(x).V_G}.\ 10^{6}$$

$$\Rightarrow C_{eq}^{G}(x^{ppm}) = \frac{\overline{\mathrm{V_M}(x)}}{V_G}\ .\ n^{tot}(x)\ (1\text{-}\frac{V_L}{V_L + H_{cc}(x).V_G})\ .\ 10^{-6}$$

$$\Rightarrow C_{eq}^{G}(x^{ppm}) = \frac{\overline{\mathrm{V_M}(x)}}{V_G}\ .\ n^{tot}(x)\ (\frac{V_L + H_{cc}(x).V_G - V_L}{V_L + H_{cc}(x).V_G})\ .\ 10^{-6}$$

$$\Rightarrow C_{eq}^{G}(x^{ppm}) = \frac{\overline{\mathrm{V_M}(x)}.H_{cc}(x).n^{tot}(x)}{V_L + H_{cc}(x).V_G}\ .\ 10^{-6}$$

or n^{tot}=n_i^G+n_i^L=n_i^L=C_i^L.V_L

Il est donc possible de calculer la concentration initiale à dissoudre en phase liquide pour obtenir la concentration souhaitée en PPM en phase gazeuse à l'équilibre.

$$C_i^L = \frac{V_L + H_{cc}.V_G}{\overline{\mathrm{V_M}}.H_{cc}.V_L}\ .\ 10^{6}$$

Annexe C

Quelques notions de microbiologie

Les domaines d'étude de la microbiologie concernent aussi bien les bactéries, les champignons, les protozoaires que les virus. La pluralité des agents infectieux étudiés en fait donc un domaine vaste et complexe. Lors de ces travaux de thèse, seules quelques espèces de bactéries ont été ciblées. Aussi cette annexe se concentre uniquement sur les éléments utiles aux travaux menés en précisant quelques notions élémentaires de microbiologies et en donnant des éléments de taxonomie des espèces testées.

C.1 Taxonomie

La taxonomie classe les organismes vivants selon leur description (caractéristiques morphologiques, métaboliques, physiologiques...). Les bactéries se subdivisent en groupes rassemblant des individus présentant des caractères communs. Ces groupes sont hiérarchisés selon des échelons allant du règne (échelon le plus large) à la souche (échelon le plus restrictif). Plusieurs souches, présentant des petites variations de caractères, peuvent appartenir à une même espèce. La figure C.1 présente la répartition des différentes souches ciblées et caractérisées durant ces travaux. Elles se répartissent en deux phyla [1] : des *Proteobacteria* et des *Firmicutes*. Elles sont doublement référencées selon leur numéro interne au laboratoire et leur 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. L'ensemble des souches est précisément référencé page 209

L'une des principales distinctions faite entre les bactéries est liée à la coloration de Gram (p.200).

1. Le phylum ou embranchement constitue le deuxième degrés de classification classique des espèces vivantes, après le règne et avant la classe.

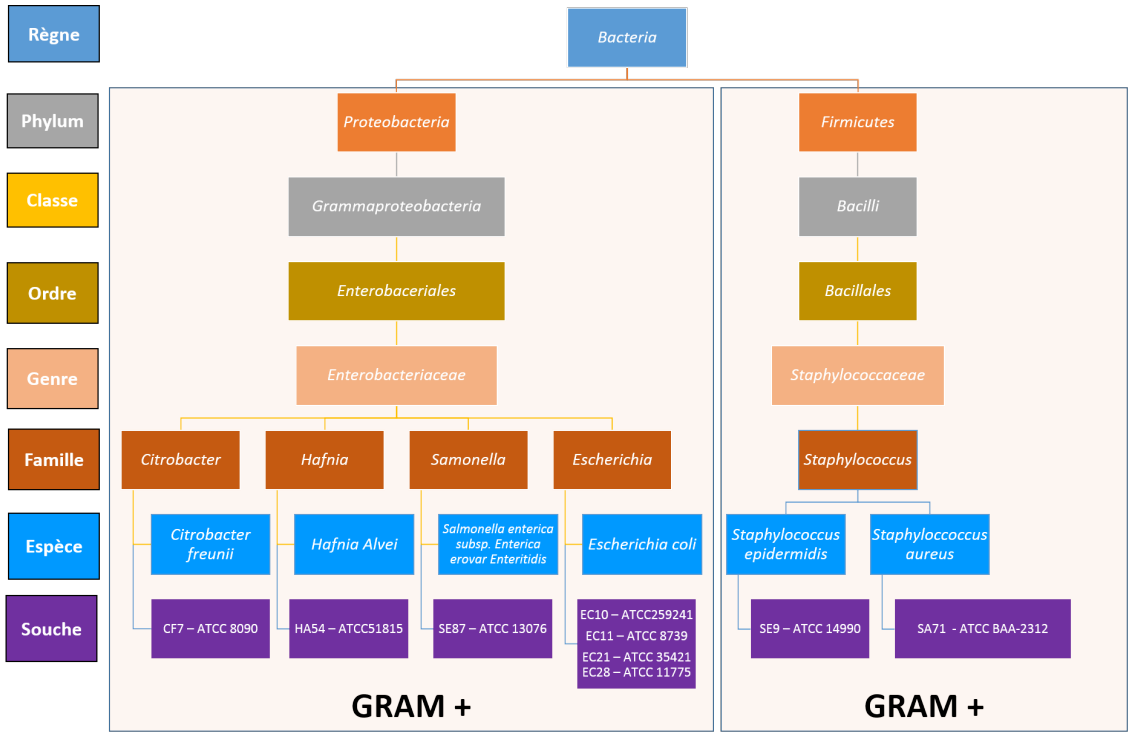


Fig. C.1 – **Taxonomie des différentes souches utilisés**

C.2 Distinction Gram+/Gram-

La coloration de Gram est l'un des critères élémentaires de classement des procaryotes. Il s'agit de les classer en deux groupes en fonction de la structure de leur paroi cellulaire. [122] C'est l'un des premiers tests d'orientation réalisés lors de l'identification d'une souche. Le groupe des Gram$^+$ se compose entre autres des genres *Bacillus*, *Listeria*, *Streptococcus*, ou *Staphylococcus*. La paroi des Gram+ est une simple membrane plasmique recouverte d'une épaisse couche de peptidoglycanes. Le groupe Gram- regroupe notamment *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Legionella*, ou *Helicobacter*. La paroi des Gram$^-$ est doublement composée d'une membrane plasmique et d'une membrane externe. Entre ces deux membranes s'insère une fine couche de peptidoglycanes.

Principe de la coloration de Gram

La coloration de Gram colore les cellules de couleurs différentes en fonction des propriétés de leur paroi. Cette méthode de classement se déroule en trois étapes (figure C.2) :

— Coloration des cellules avec du violet de gentiane. Le pigment se fixe sur les composants du cytoplasme de toutes les cellules qui, quelle que soit leur paroi, se colorent en violet. Pour fixer la coloration du Lugol (diiode et iodure de potassium) est étalée sur les cellules.

— Décoloration sélective, par rinçage avec de l'éthanol à 95% ou un mélange éthanol-acétone. Les parois riches en peptidoglycanes (Gram$^+$) ne laissent pas passer l'alcool : les cellules conservent leur coloration. Les parois des Gram$^-$ laissent passer le solvant l'alcool qui élimine le violet de gentiane et décolore les cellules.
— Contre-coloration. Afin d'augmenter le contraste et de permettre l'observation des cellules au microscope optique, une contre-coloration à la safranine ou à la fuchsine, suivie d'un rinçage est effectuées. Cette étape n'affecte pas les Gram$^+$ mais uniquement les Gram$^-$

Fig. C.2 – **Protocole de la coloration de Gram**

Croissance bactérienne

La croissance bactérienne est une succession de divisions cellulaires, elle est évaluée en unité formant colonie (ufc) qui correspond au nombre de cellules viables formant une colonie sur un milieu gélosé. Que ce soit le milieu de culture, liquide ou gélosé, l'une des conditions de la croissance est la présence de nutriments. Les cycles de vie d'une culture se décomposent en quatre étapes.

— **Phase de latence** : la bactérie synthétise les enzymes nécessaires pour métaboliser les nutriments du milieu et s'adapte à son environnement (température, pH, osmolarité, etc.). A ce stade il n'y a pas de division cellulaire.
— **Phase de croissance exponentielle** : La division cellulaire permet la croissance, durant cette période elle est maximale et constante. Le temps de génération est, alors, défini comme le temps nécessaire pour doubler la population.
— **Phase de ralentissement** : Les nutriments du milieu commencent à s'épuiser tandis que les déchets métaboliques s'accumulent. La division cellulaire a encore

lieu mais est plus lente.

— **Phase stationnaire** : La division cellulaire n'est plus permise faute de nutriments suffisant. La concentration en cellules demeure stable.

— **Phase de décroissance** : Faute de nutriment, le taux de mortalité augmente et la concentration en cellules viables diminue.

Annexe D

Méthode du nombre le plus probable et tables de McGrady

Principe

La méthode de McGrady est une approche statistique de comptage des organismes viables développée par McGrady en 1915 [14]. Cette méthode permet de ramener un problème quantitatif à un problème de détection. Elle permet le calcul d'une concentration bactérienne au sein d'une solution mère grâce à une simple détection dans des solutions diluées.

Comme l'illustre la figure D.1 la suspension bactérienne de concentration inconnue est ramenée à une somme de petits volumes dans lesquels une unité formant colonie (ufc) peut être présente ou non.

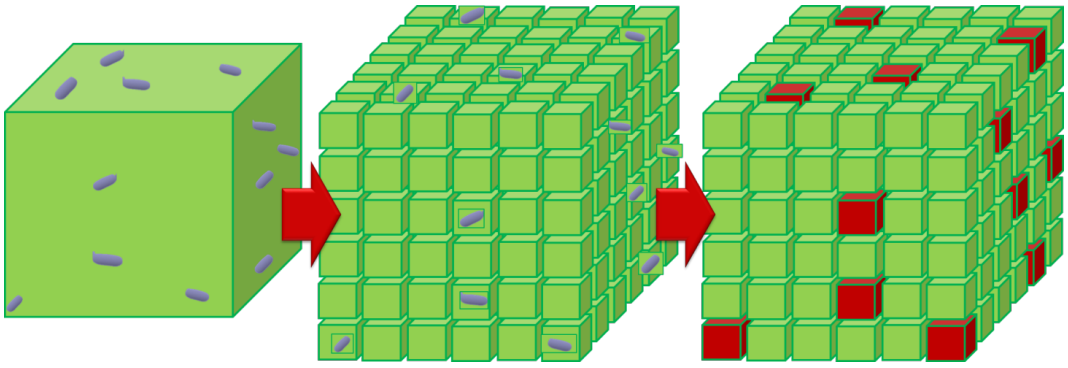


Fig. D.1 – **Principe de McGrady** La numération est ramenée à un problème de détection

.

La suspension bactérienne est diluée plusieurs fois par 10. L'idée est que dans la suspension la plus diluée, la biomasse soit si peu concentrée que pour chaque extrait, il est possible de capturer 0 ou 1 unique ufc. De fait, un nombre standardisé d'essais par décade de concentration est réalisé en parallèle. Les échantillons positifs (rouges) contiennent une ou plusieurs unités formant colonie, en milieu liquide non diffusant un trouble de

la solution est visible. Les échantillons négatifs (verts) ne présentent pas de changement optique particulier. L'analyse des résultats se fait par dénombrement des essais positifs et négatifs. Le nombre d'essais positifs par décade permet d'obtenir un nombre appelé le nombre caractéristique (à 3 chiffres).

Détermination du nombre caractéristique Le nombre caractéristique est déterminé selon le protocole présenté ci-dessous et illustré figure D.2 :

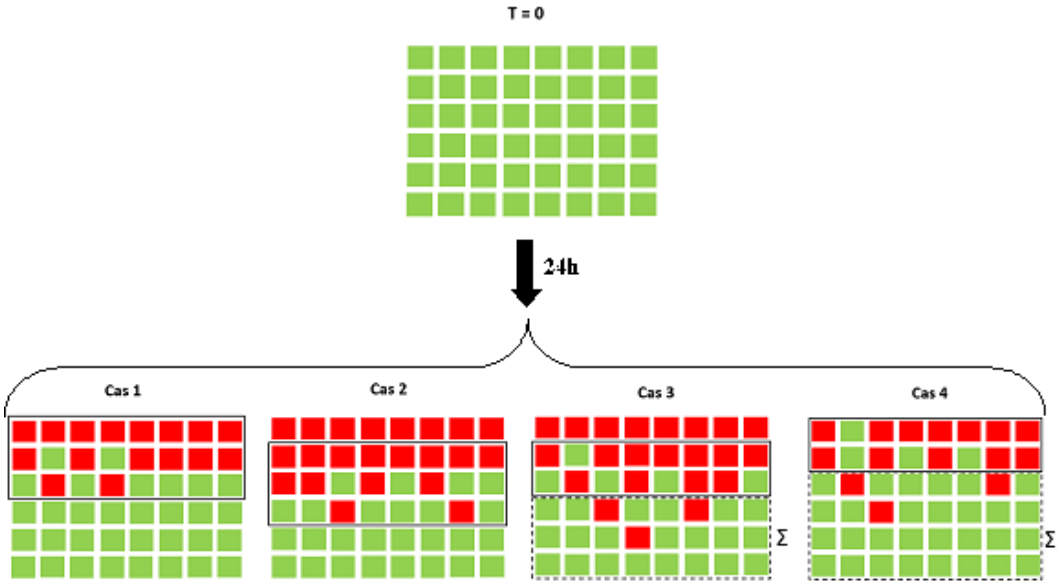


Fig. D.2 – **Exemples illustrant la détermination du nombre caractéristique**. Chaque ligne correspond à une concentration donnée, et tous les puits de la ligne ont la même concentration. Les carrées rouge représentent les puits positif tandis que les puits en vert sont négatifs

.

: La première étape est d' liminer la décade la plus concentrée où zéro échantillon positif n'est obtenu ainsi que les décades inférieures. Plusieurs cas de figure peuvent alors se présenter. Il convient de :

— refaire l'analyse en diluant mois, s'il reste moins de trois décades,

— se reporter au cas 1, s'il ne reste que trois

— se reporter au cas 2 à 4 s'il reste plus de trois décade se reporter

Cas 1 : Le nombre d'essais positifs de chaque décade, par ordre de concentration décroissante, détermine les trois chiffres du nombre : (**8 − 6 - 2**).

Cas 2 : La décade la plus diluée entièrement positive appartient aux trois décades de plus faibles concentrations restantes. Le nombre d'essais positifs des trois décades inférieures détermine les trois chiffres du nombre caractéristique (par ordre de concentration décroissante) : (**8 − 4 - 2**).

Cas 3 : La décade la plus diluée entièrement positive n'appartient pas aux trois décades de plus faibles concentrations restantes. Les deux décades de concentration inférieure à celle entièrement positive donnent les deux premiers chiffres du nombre

caractéristique. Le troisième chiffre correspond aux nombres d'essais positifs dans l'ensemble des décades inférieures (**7 − 4 - 3**)

Cas 4 : Aucune décade n'est entièrement positive. Les deux décades de plus fortes concentrations donnent les deux premiers chiffres du nombre caractéristique. Le troisième chiffre correspond aux nombres d'essais positifs dans l'ensemble des décades inférieures (**7 − 5 - 3**)

Interprétation du nombre caractéristique

Une fois le nombre caractéristique obtenu, celui-ci est interprété *via* les tables de McGrady où trois nombres sont donnés en fonction du nombre caractéristique. Le premier nombre est le nombre le plus probable, qui correspond au nombre total d'ufc dans la décade de plus forte concentration ayant servie à déterminer le nombre caractéristique. Ce nombre permet de calculer la concentration la plus probable dans la solution initiale suivant l'équation D.1.

$$[C_i] = \frac{NPP.k}{V} \tag{D.1}$$

NPP : nombre le plus probable (ufc) - k : facteur de dilution de la décade de plus forte concentration - V : le volume d'essai (mL)

Les deux autres nombres correspondent à des bornes qui permettent de calculer l'intervalle de confiance 95%. Le calcul des bornes de l'intervalle est effectué par l'équation D.1 en remplaçant le nombre le plus probable par les valeurs inférieure ou supérieure données par les tables de Mc-Grady.

Annexe E

Produits réactionnels

E.1 Produits réactionnels

Composé	Abréviation	CAS	Fournisseur	Réf. Fournisseur
Formulation des Xérogels				
Tetraethyl orthosilicate ≥ 99.0% (GC)	TEOS	78-10-4	Sigma-Aldrich	86578
Tetramethyl orthosilicate ≥ 99%	TMOS	681-84-5	Sigma-Aldrich	341436
Ethanol absolute, for HPLC, ≥ 99.8%	EtOH	64-17-5	Sigma-Aldrich	34852
	MeOH	67-56-1	Sigma-Aldrich	
n,n-bis(2-hydroxyethyl)-3-aminopropyltriethoxysilane, 62	HEAPTES	7538-44-5	Gelest	SIB1140.0
n-Butyltrimethoxysilane	n-butyl	1067-57-8	Gelest	SIB1988.0
3-methoxypropyltrimethoxysilane	3MPTMS	33580-59-5	Gelest	SIM6493.0
n-octadecyltrimethoxysilane	ODTES	7399-00-0	Gelest	SIO6642.0
3-acetoxypropyltrimethoxysilane	TMSP	59004-18-1	Gelest	SIA0100.0
3-mercaptopropyltrimethoxysilane	TMSPT	4420-74-0	Gelest	SIM6476.0
(3-acetamidopropyl)trimethoxysilane	TMSPA	57757-66-1	Gelest	SIA0006.0
4-aminobutyltriéthoxysilane, 95%	ABTES	3069-30-5	Gelest	SIA0587.0
p-aminophenyltrimethoxysilane, 90%	APhTMS	33976-43-1	Gelest	SIA0599.1
3-aminopropyldimethylethoxysilane	APMTES	18306-79-1	Gelest	SIA0603.0
3-aminopropyltriethoxysilane	APTES	919-30-2	Gelest	SIA0610.0
phenyltrimethoxysilane	PhTMS	2996-92-1	Gelest	SIP6822.0
(3 3 3-trifluoropropyl)trimethoxysilane, 98%	TFPTMS	429-60-7	Gelest	SIT8372.0
Catalyseurs acides et basiques				
acide chlorhydrique	HCl	7647-01-0	Sigma-Aldrich	320331
aide trifluoroacétique	TFA	76-05-1	Sigma-Aldrich	
Molécules Sondes				

sel disodique 4,4'-Bis (p-hydroxyphenylazo) stilbene-2,2'-disulfonic acide	BY	3051-11-4	Sigma-Aldrich	201375
Pigments de Reichardt ou 2,6-Diphenyl-4-(2,4,6-triphenyl-1-pyridinio)phenolate, 2,6-Diphenyl-4-(2,4,6-triphenylpyridinio)phenolate	RD	10081-39-7	Sigma-Aldrich	272442
Vert de malachite ou 4-[(4-dimethylaminophenyl)-phenyl-methyl]- N,N-dimethyl-aniline	MG		Sigma-Aldrich	
5,10,15,20-Tetrakis(4-metho xyphenyl)-21H,23H-porphine cobalt(II)	MCoTPP	28903-71-1	Sigma-Aldrich	275867
p-dimethylaminocinnamaldehyde	DMACA	6203-18-5	Sigma-Aldrich	D4506
(5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)	DTNB	69-78-3	Sigma-Aldrich	D8130
Bleu de méthylène	MB	122965-43-9	Sigma-Aldrich	M9140
Bleu de bromothymol (sel de sodium)	BBT	34722-90-2	Sigma-Aldrich	B8630
Bleu de bromophénol (sel de sodium)	BBP	34725-61-6	Sigma-Aldrich	B5525
Bleu de thymol	BT	76-61-9	Sigma-Aldrich	114545
Substrats Enzymatiques				
2-nitrophényl-α-D-glucopyranoside	α-GLU-2-NP	56193-44-3	Carbosynth	EN43851
2-Naphthyl-β-D-galactopyranoside hydrate	β-GAL-2-NoL	312693-81-5	Sigma	860492
2-Nitrophenyl β-D-galactopyranoside	β-GAL-2-NP	369-07-3	Sigma	73660
2-Nitrophenyl caprylate	C8-2-NP	104809-25-8	Carbosynth	EN15363
2-Nitrophenyl β-D-glucuronide	β-GUR-2-NP	137629-36-8	Carbosynth	EN04827

E.2 Souches bactériennes

référence interne	*espèce*	Numéro ATCC
AB51	Acinetobacter baumannii	ATCC 19606
CF7	Citrobacter freundii	ATCC 8090
EC8	Enterobacter cloacae	ATCC 13047
EC10	Escherichia coli	ATCC 25922
EC11	Escherichia coli	ATCC 8739
EC21	Escherichia coli	ATCC 35421
EC28	Escherichia coli	ATCC 11775
HA54	Hafnia alvei	ATCC 51815
PP6	Pseudomonas putida	ATCC 12633
PP46	Pseudomonas putida	ATCC 31483
SA75	Staphylococcus aureus subsp. aureus	ATCC 14775
SE9	Staphylococcus epidermidis	ATCC 14990
SE26	Staphylococcus epidermidis	ATCC 12228
SE67	Staphylococcus epidermidis	ATCC 51625
SE87	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis	ATCC 13076
SE97	Staphylococcus epidermidis	ATCC 35984

Tab. E.1 – Numéro ATCC : American Type Culture Collection

Références bibliographiques

[1] Vijayalakshmi Velusamy, Khalil Arshak, Olga Korostynska, Kamila Oliwa, and Catherine Adley. An overview of foodborne pathogen detection : in the perspective of biosensors. *Biotechnology Advances*, 28(2) :232–254, April 2010.

[2] Evangelyn C. Alocilja and Stephen M. Radke. Market analysis of biosensors for food safety. *Biosensors & Bioelectronics*, 18(5) :841–846, May 2003.

[3] *ISO 6579 :2002 - Microbiologie des aliments – Méthode horizontale pour la recherche des Salmonella spp.*

[4] Pierre Marcoux. *Méthodes optiques pour le diagnostic phénotypique rapide en microbiologie*. phdthesis, October 2017.

[5] Stephen G. Oliver, Michael K. Winson, Douglas B. Kell, and Frank Baganz. Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends in Biotechnology*, 16(9) :373 – 378, 1998.

[6] G. Q. Lu and X. S. Zhao, editors. *Nanoporous materials : science and engineering*. Number v. 4 in Series on chemical engineering. Imperial College Press, London, 2004. OCLC : ocm57302630.

[7] Arnaud Plassais. *Nanoporosité, texture et propriétés mécaniques de pâtes de ciments*. phdthesis, Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, January 2003.

[8] G. Ferey. A Chromium Terephthalate-Based Solid with Unusually Large Pore Volumes and Surface Area. *Science*, 309(5743) :2040–2042, September 2005.

[9] R. Bassette, R. E. Bawdon, and T. J. Claydon. Production of Volatile Materials in Milk by Some Species of Bacteria1,2. *Journal of Dairy Science*, 50(2) :167–171, February 1967.

[10] Amy C Rosenzweig and Stephen W Ragsdale. *Methods in methane metabolism. Volume 494, Volume 494,*. Elsevier/Academic Press, Amsterdam [Netherlands] ; Boston [Mass., 2011.

[11] Shahzi S Iqbal, Michael W Mayo, John G Bruno, Burt V Bronk, Carl A Batt, and James P Chambers. A review of molecular recognition technologies for detection of biological threat agents. *Biosensors and Bioelectronics*, 15(11-12) :549–578, December 2000.

[12] Ghassan M. Matar, Peggy S. Hayes, William F. Bibb, and Bala Swaminathan. Listeriolysin O-Based Latex Agglutination Test for the Rapid Detection of Listeria monocytogenes in Foods. *Journal of Food Protection*, 60(9) :819–826, September 1997.

[13] Marjorie B. Medina, Weilin L. Shelver, Pina M. Fratamico, Laurie Fortis, Glenn Tillman, Neelam Narang, William C. Cray, Emilio Esteban, and Chitrita DebROY. Latex Agglutination Assays for Detection of Non-O157 Shiga Toxin–Producing Escherichia coli Serogroups O26, O45, O103, O111, O121, and O145. *Journal of Food Protection*, 75(5) :819–826, May 2012.

[14] P. T. Feldsine, A. H. Lienau, R. L. Forgey, and R. D. Calhoon. Visual immunoprecipitate assay (VIP) for Listeria monocytogenes and related Listeria species detection in selected foods : collaborative study. *Journal of AOAC International*, 80(4) :791–805, August 1997.

[15] Won-Bo Shim, Jin-Gil Choi, Ji-Young Kim, Zheng-You Yang, Kyu-Ho Lee, Min-Gon Kim, Sang-Do Ha, Keun-Sung Kim, Kwang-Yup Kim, Cheol-Ho Kim, Kwang-Soo Ha, Sergei A. Eremin, and Duck-Hwa Chung. Production of monoclonal antibody against Listeria monocytogenes and its application to immunochromatography strip test. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17(7) :1152–1161, July 2007.

[16] B. Fiori, T. D'Inzeo, A. Giaquinto, G. Menchinelli, F. M. Liotti, F. de Maio, G. De Angelis, G. Quaranta, D. Nagel, M. Tumbarello, B. Posteraro, M. Sanguinetti, and T. Spanu. Optimized Use of the MALDI BioTyper System and the FilmArray BCID Panel for Direct Identification of Microbial Pathogens from Positive Blood Cultures. *Journal of Clinical Microbiology*, 54(3) :576–584, March 2016.

[17] Amy L. Leber, Kathy Everhart, Joan-Miquel Balada-Llasat, Jillian Cullison, Judy Daly, Sarah Holt, Paul Lephart, Hossein Salimnia, Paul C. Schreckenberger, Sharon DesJarlais, Sharon L. Reed, Kimberle C. Chapin, Lindsay LeBlanc, J. Kristie Johnson, Nicole L. Soliven, Karen C. Carroll, Jo-Anne Miller, Jennifer Dien Bard, Javier Mestas, Matthew Bankowski, Tori Enomoto, Andrew C. Hemmert, and Kevin M. Bourzac. Multicenter Evaluation of BioFire FilmArray Meningitis/Encephalitis Panel for Detection of Bacteria, Viruses, and Yeast in Cerebrospinal Fluid Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 54(9) :2251–2261, September 2016.

[18] Tsugunori Notomi, Hiroto Okayama, Harumi Masubuchi, Toshihiro Yonekawa, Keiko Watanabe, Nobuyuki Amino, and Tetsu Hase. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, 28(12) :e63, June 2000.

[19] Vincent Templier. *Exploration de méthodes alternatives pour la détection de bactéries dans le sang.* phdthesis, Université Grenoble Alpes, November 2016.

[20] *Rapid and label-free bacteria detection by surface plasmon resonance (SPR) biosensors - Dudak - 2009 - Biotechnology Journal - Wiley Online Library.*

[21] Sihem Bouguelia, Yoann Roupioz, Sami Slimani, Laure Mondani, Maria G. Casabona, Claire Durmort, Thierry Vernet, Roberto Calemczuk, and Thierry Livache. On-chip microbial culture for the specific detection of very low levels of bacteria. *Lab on a Chip*, 13(20) :4024–4032, October 2013.

[22] Wendy F. Lauer and Frederic L. Martinez. RAPID'Salmonella chromogenic medium. Performance Tested Method 050701. *Journal of AOAC International*, 92(6) :1871–1875, December 2009.

[23] Sihem Bouguelia. *Développement de biopuces dédiées à la détection de bactéries pathogènes à faibles taux*. Grenoble, October 2012.

[24] Randall A. Allardyce, Vaughan S. Langford, Alex L. Hill, and David R. Murdoch. Detection of volatile metabolites produced by bacterial growth in blood culture media by selected ion flow tube mass spectrometry (SIFT-MS). *Journal of Microbiological Methods*, 65(2) :361–365, May 2006.

[25] Nathalie Polet, Nadine Botteldoorn, and Katelijne Dierick. MALDI-TOF MS comme outil d'identification de pathogènes alimentaires. *Agence fédérale pour la sécurité de la chaine alimentaire (AFSCA)*, (LABINFO N°13) :pp. 12–14, April 2015.

[26] Neelja Singhal, Manish Kumar, Pawan K. Kanaujia, and Jugsharan S. Virdi. MALDI-TOF mass spectrometry : an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in Microbiology*, 6, August 2015.

[27] Lorena Porte, Patricia García, Stephanie Braun, María Teresa Ulloa, Mónica Lafourcade, Alisson Montaña, Carolina Miranda, Gerardo Acosta-Jamett, and Thomas Weitzel. Head-to-head comparison of Microflex LT and Vitek MS systems for routine identification of microorganisms by MALDI-TOF mass spectrometry in Chile. *PLoS ONE*, 12(5), May 2017.

[28] Matthew L. Faron, Blake W. Buchan, Josh Hyke, Neil Madisen, Jennifer L. Lillie, Paul A. Granato, Deborah A. Wilson, Gary W. Procop, Susan Novak-Weekley, Elizabeth Marlowe, Joven Cumpio, Christen Griego-Fullbright, Sandra Kindig, Karen Timm, Stephen Young, and Nathan A. Ledeboer. Multicenter Evaluation of the Bruker MALDI Biotyper CA System for the Identification of Clinical Aerobic Gram-Negative Bacterial Isolates. *PLoS ONE*, 10(11), November 2015.

[29] C Kendall. *Detection Challenges in Clinical Diagnostics*. September 2013.

[30] J. Chenau, S. Michelland, and M. Seve. Le sécrétome : définitions et intérêt biomédical. *La Revue de Médecine Interne*, 29(7) :606–608, July 2008.

[31] M. B. Miller and B. L. Bassler. Quorum sensing in bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 55 :165–199, 2001.

[32] Julie Oziat. *Développement d'un matériau conducteur biocompatible pour le monitoring de cultures cellulaires*. November 2016.

[33] Julie Oziat, Sylvie Elsen, Roisin M. Owens, George G. Malliaras, and Pascal Mailley. Electrochemistry provides a simple way to monitor Pseudomonas aeruginosa metabolites. *Conference proceedings : ... Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. Annual Conference*, 2015 :7522–7525, 2015.

[34] Stefan Schulz and Jeroen S. Dickschat. Bacterial volatiles : the smell of small organisms. *Natural Product Reports*, 24(4) :814, 2007.

[35] Julian W. Gardner and Philip N. Bartlett. A brief history of electronic noses. *Sensors and Actuators B : Chemical*, 18(1-3) :210–211, March 1994.

[36] Maria Genua. *Combinatorial surface-based electronic tongue development : Analytical applications and conception of 2D and 3D biomimetic surfaces*. Grenoble, October 2013.

[37] Joon-Boo Yu, Hyung-Gi Byun, Myung-Suk So, and Jeung-Soo Huh. Analysis of diabetic patient's breath with conducting polymer sensor array. *Sensors and Actuators B : Chemical*, 108(1-2) :305–308, July 2005.

[38] Lieuwe D. J. Bos, Peter J. Sterk, and Marcus J. Schultz. Volatile Metabolites of Pathogens : A Systematic Review. *PLOS Pathogens*, 9(5) :e1003311, May 2013.

[39] Kenneth S. Suslick, Neal A. Rakow, Avijit Sen, Mcnamara B. William III, and Margaret E. Kosal. Colorimetric artificial nose having an array of dyes and method for artificial olfaction, July 2003.

[40] Michael C Janzen, Jennifer B Ponder, Daniel P Bailey, Crystal K Ingison, and Kenneth S Suslick. Colorimetric sensor arrays for volatile organic compounds. *Analytical chemistry*, 78(11) :3591–3600, 2006.

[41] Kenneth Suslick, Keren Hulkower, Avijit Sen, Mitchell Sroka, and William McNamara. Method and apparatus for detecting ammonia from exhaled breath, February 2005.

[42] Yu W. Chu, Bo Y. Wang, David A. Engebretson, and James R. Carey. Single step, rapid identification of pathogenic microorganisms in a culture bottle. *The Analyst*, 138(20) :5879–5885, October 2013.

[43] Yu W. Chu, Bo Y. Wang, David A. Engebretson, and James R. Carey. Single step, rapid identification of pathogenic microorganisms in a culture bottle. *The Analyst*, 138(20) :5879–5885, October 2013.

[44] Sylvain Orenga, Arthur L. James, Mohammed Manafi, John D. Perry, and David H. Pincus. Enzymatic substrates in microbiology. *Journal of Microbiological Methods*, 79(2) :139–155, November 2009.

[45] Vincenzo Aurilia, Antonietta Parracino, and Sabato D'Auria. Microbial carbohydrate esterases in cold adapted environments. *Gene*, 410(2) :234–240, March 2008.

[46] P. Marcoux, M. Dupoy, L.H. Guillemot, and T.H. Tran-Thi. *Method for Classifying the Presence or Absence of a Microorganism in a Biological Medium*. Google Patents, June 2014.

[47] R. Sander. Compilation of Henry's law constants (version 4.0) for water as solvent. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 15(8) :4399–4981, April 2015.

[48] Emma Tait, John D. Perry, Stephen P. Stanforth, and John R. Dean. Bacteria detection based on the evolution of enzyme-generated volatile organic compounds : Determination of Listeria monocytogenes in milk samples. *Analytica Chimica Acta*, 848(Supplement C) :80–87, October 2014.

[49] Sabine Crunaire, Pierre Marcoux, Khanh-Quyen Ngo, Jean-Pierre Moy, Frédéric Mallard, and Thu-Hoa Tran-Thi. Discriminating Bacteria with Optical Sensors Based on Functionalized Nanoporous Xerogels. *Chemosensors*, 2(2) :171–181, June 2014.

[50] 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., BacT/Alert : an automated colorimetric microbial detection system. *Journal of clinical microbiology, Journal of Clinical Microbiology*, 28, 28(7, 7) :1608, 1608–1612, July 1990.

[51] Martin C. Easter, editor. *Rapid microbiological methods in the pharmaceutical industry*. Interpharm/CRC, Boca Raton, Fla, 2003.

[52] *Electrochemical Sensors, Biosensors and their Biomedical Applications - Read Online*.

[53] Hélène Paolacci. *Capteurs chimiques à transduction optique de polluants atmosphériques à base de matériaux nanoporeux : application au formaldéhyde et autres composés carbonylés*. PhD Thesis, Paris 11, 2006.

[54] C. Jeffrey Brinker and George W. Scherer. *Sol-gel Science : The Physics and Chemistry of Sol-gel Processing*. Gulf Professional Publishing, 1990.

[55] Morten Bo Mikkelsen, Alban A. Letailleur, Elin Søndergård, Etienne Barthel, Jérémie Teisseire, Rodolphe Marie, and Anders Kristensen. All-silica nanofluidic devices for DNA-analysis fabricated by imprint of sol-gel silica with silicon stamp. *Lab on a Chip*, 12(2) :262–267, January 2012.

[56] María Comes, M Dolores Marcos, Ramon Martínez-Máñez, Félix Sancenón, Juan Soto, Luis A Villaescusa, Pedro Amorós, and Daniel Beltrán. Chromogenic discrimination of primary aliphatic amines in water with functionalized mesoporous silica. *Advanced Materials*, 16(20) :1783–1786, 2004.

[57] Laure-Hélène Guillemot, Marjorie Vrignaud, Pierre R. Marcoux, Charles Rivron, and Thu-Hoa Tran-Thi. Facile and fast detection of bacteria via the detection of

exogenous volatile metabolites released by enzymatic hydrolysis. *Physical chemistry chemical physics : PCCP*, 15(38) :15840–15844, October 2013.

[58] Pierre Marcoux, Laure-hélène Guillemot, Zoé Buniazet, and Marjorie Vrignaud. Material and method for capturing, detecting and quantifying volatile sulphur compounds, April 2016.

[59] Marjorie Vrignaud. *Matrices nanoporeuses pour la détection de métabolites volatils microbiens par transduction optique directe*. Grenoble Alpes, November 2015.

[60] Brian J. Melde, Brandy J. Johnson, and Paul T. Charles. Mesoporous Silicate Materials in Sensing. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 8(8) :5202–5228, August 2008.

[61] J. Hue, M. Dupoy, T. Bordy, R. Rousier, S. Vignoud, T. H. Tran-Thi, C. Rivron, L. Mugherli, Y. Bigay, P. Karpe, and M. Charbonnier. Benzene Detection by Absorbance in the Range of 20 ppb-100 ppb Application : Quality of Indoor Air. *Procedia Engineering*, 47(Supplement C) :232–235, January 2012.

[62] Laure Hélène 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)*. Paris 11, October 2012.

[63] Marjorie Vrignaud. *Matrices nanoporeuses pour la détection de métabolites volatils microbiens par transduction optique directe*. Grenoble Alpes, November 2015.

[64] Ali Sarafraz-Yazdi, Amirhassan Amiri, Gholamhossein Rounaghi, and Hossein Eshtiagh Hosseini. A novel solid-phase microextraction using coated fiber based sol–gel technique using poly(ethylene glycol) grafted multi-walled carbon nanotubes for determination of benzene, toluene, ethylbenzene and o-xylene in water samples with gas chromatography-flam ionization detector. *Journal of Chromatography A*, 1218(34) :5757–5764, August 2011.

[65] J. Livage and C. Sanchez. Sol-gel chemistry. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 145 :11–19, January 1992.

[66] Bénédicte Lebeau and Clément Sanchez. Sol-gel derived hybrid inorganic-organic nanocomposites for optics. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 4(1) :11 – 23, 1999.

[67] William Bamogo. *Capteurs chimiques à base de matrices nanoporeuses pour la détection de métabolites volatils de la tuberculose*. PhD thesis, 2015. Thèse de doctorat dirigée par Tran-Thi, Thu-Hoa Chimie Paris 11 2015.

[68] Matthew D. Curran and A. E. Stiegman. Morphology and pore structure of silica xerogels made at low pH. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 249(1) :62 – 68, 1999.

[69] Jang Wook Choi. *Bistable [2]rotaxane based molecular electronics : fundamentals and applications*. phd, California Institute of Technology, 2007.

[70] Nicolas Menguy. Méthodes d'Investigation des Matériaux – Chapitre III. Technical report, Université Pierre-et-Marie-Curie, 2015.

[71] Arnaud De Geyer. Small angle X-ray scattering : application to nanomaterials. Technical report, CEA-INAC, 2015.

[72] Brian R. Pauw, Hiroki Ogawa, and Takumi Takano. How to do a perfect SAXS measurement. 2011.

[73] ethera-td. Une technologie unique : les capteurs nanoporeux, May 2017.

[74] R Lailler, S Frémy, C Oudart, and C Piquet. Inventaire des samonella d'origine non humaine, réseau salmonella 2010. Technical report, ANSES (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail), 2010.

[75] Peter Eyer, Franz Worek, Daniela Kiderlen, Goran Sinko, Anita Stuglin, Vera Simeon-Rudolf, and Elsa Reiner. Molar absorption coefficients for the reduced Ellman reagent : reassessment. *Analytical Biochemistry*, 312(2) :224–227, January 2003.

[76] P. W. Riddles, R. L. Blakeley, and B. Zerner. Ellman's reagent : 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)–a reexamination. *Analytical Biochemistry*, 94(1) :75–81, April 1979.

[77] Q. Lei and W. L. Boatright. Development of a new methanethiol quantification method using ethanethiol as an internal standard. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(8) :3567–3572, August 2001.

[78] Wilhelm Boland and Dieter Spiteller. Electronic Noses. In *Bioresponse-Linked Instrumental Analysis*, Teubner-Reihe UMWELT, pages 57–78. Vieweg+Teubner Verlag, 2001.

[79] Denis Puthier. Analyse en composantes principales. Technical report, Laboratoire INSERM TAGC/ERM206, 2007.

[80] Aurélie Fischer. Deux méthodes d'apprentissage non supervisé : synthèse sur la méthode des centres mobiles et présentation des courbes principales. *Journal de la Société Française de Statistique*, December 2009.

[81] Anne B Dufour. Analyse en Composantes Principales. Technical report, Université Lyon 1, 2013.

[82] Brandy Johnson-White, Mazyar Zeinali, Kara M. Shaffer, Charles H. Patterson, Paul T. Charles, and Michael A. Markowitz. Detection of organics using porphyrin embedded nanoporous organosilicas. *Biosensors and Bioelectronics*, 22(6) :1154–1162, January 2007.

[83] J Cenens and Robert Schoonheydt. Visible Spectroscopy of Methylene Blue on Hectorite, Laponite B, and Barasym in Aqueous Suspension. *Clays and Clay Minerals - CLAYS CLAY MINER*, 36 :214–224, June 1988.

[84] Surojit Pande, Sujit Kumar Ghosh, Sudip Nath, Snigdhamayee Praharaj, Subhra Jana, Sudipa Panigrahi, Soumen Basu, and Tarasankar Pal. Reduction of methylene blue by thiocyanate : Kinetic and thermodynamic aspects. *Journal of Colloid and Interface Science*, 299(1) :421–427, July 2006.

[85] Jiannong. Ye and Richard P. Baldwin. Catalytic reduction of myoglobin and hemoglobin at chemically modified electrodes containing methylene blue. *Analytical Chemistry*, 60(20) :2263–2268, October 1988.

[86] J. Kulys, K. Krikstopaitis, F. W. Scheller, and U. Wollenberger. Electrochemical Parameters of Phenoxazine Derivatives in Solution and at Monolayer-Modified Gold Electrodes. *Electroanalysis*, 16(3) :183–189, February 2004.

[87] *Méthanethiol, Ethanethiol et 1-Butanethiol (FT 190) - Fiche toxicologique - INRS.*

[88] *Sulfure d'hydrogène (FT 32) - Fiche toxicologique - INRS.*

[89] *Fiche complète pour Acétophénone - CNESST.*

[90] *Acétate d'éthyle (141-78-6) - Solvant - INRS.*

[91] *Dipentène ou d,l-Limonène (FT 227) - Fiche toxicologique - INRS.*

[92] *Fiche de données de sécurité - Labkem - alcool isoamylique.* October 2017.

[93] *FT114 Diéthylamine - Publication scientifique - INRS.*

[94] *ChemIDplus - Indole - SIKJAQJRHWYJAI-UHFFFAOYSA-N - Similar structures search, synonyms, formulas, resource links, and other chemical information.*

[95] *Fiche complète pour Acétophénone - CNESST.*

[96] P. Goullet, B. Picard, and C. Richard. Caractérisation de Escherichia hermannii par électrophorèse des estérases, de la phosphatase acide et des glutamate-et malate-déshydrogénases. *Annales de l'Institut Pasteur / Microbiologie*, 137(1) :295–299, January 1986.

[97] Olivier Tenaillon, David Skurnik, Bertrand Picard, and Erick Denamur. The population genetics of commensal Escherichia coli. *Nature Reviews Microbiology*, 8(3) :207–217, March 2010.

[98] Mee-Jung Han and Sang Yup Lee. The Escherichia coli Proteome : Past, Present, and Future Prospects. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(2) :362–439, June 2006.

[99] Geneviève Wahart, Eric Julian, Gilles Pivert, Philippe Coudol, and Annabel Meunier. Panorama des automates de laboratoires (actualisation) coordination : Philippe Casier (Bayeux). *ITBM RBM news*, 25(2) :11–35, 2004.

[100] *Rapid and label-free bacteria detection by surface plasmon resonance (SPR) biosensors - Dudak - 2009 - Biotechnology Journal - Wiley Online Library.*

[101] Brigitte Lamy. Automates pour hémoculture an 2005. *Bio Tribune Magazine*, 16 :35–40, January 2005.

[102] Pamela S. Naden, Gareth H. Old, Caroline Eliot-Laize, Steve J. Granger, Jane M. B. Hawkins, Roland Bol, and Phil Haygarth. Assessment of natural fluorescence as a tracer of diffuse agricultural pollution from slurry spreading on intensely-farmed grasslands. *Water Research*, 44(6) :1701–1712, March 2010.

[103] E. V. Samsonova, A. V. Popov, A. S. Vanetsev, K. Keevend, K. Kaldvee, L. Puust, A. E. Baranchikov, A. V. Ryabova, S. G. Fedorenko, V. Kiisk, I. Sildos, J. Kikas, R. Steiner, V. B. Loschenov, and Yu. V. Orlovskii. Fluorescence quenching mechanism for water-dispersible Nd3+ :KYF4 nanoparticles synthesized by microwave-hydrothermal technique. *Journal of Luminescence*, 169(Part B) :722–727, January 2016.

[104] M. R. Chapple, G. D. Johnson, and R. S. Davidson. Fluorescence quenching ; a practical problem in flow cytometry. *Journal of Microscopy*, 159(Pt 3) :245–253, September 1990.

[105] Salvatore A. E. Marras, Fred Russell Kramer, and Sanjay Tyagi. Efficiencies of fluorescence resonance energy transfer and contact-mediated quenching in oligonucleotide probes. *Nucleic Acids Research*, 30(21) :e122, November 2002.

[106] Bernard Valeur. *Invitation à la fluorescence moléculaire.* De Boeck Supérieur, September 2004.

[107] Rick Ghauharali and G.J. Brakenhoff. Fluorescence photobleaching-based image standardization for fluorescence microscopy. *Journal of microscopy*, 198 (Pt 2) :88–100, June 2000.

[108] A. Débarre, P. Tchénio, J. Azoulay, R. Jaf iol, and D. Nutarelli. Analyse de la dynamique temporelle d'une molécule unique en matrice sol-gel. *Journal de Physique IV (Proceedings)*, 12(5) :287–288, June 2002.

[109] Bernard Valeur. *Invitation à la fluorescence moléculaire.* De Boeck, Bruxelles, 2005.

[110] Dan Wu and Robert J. Hurtubise. Fluorescence properties of 1-naphthol, 2-naphthol and 1,2,3,4-tetrahydronaphthol in aqueous alcohol solvents with and withoutb-cyclodextrin. *Talanta*, 40(6) :901–907, June 1993.

[111] Pierre Marcoux, Laure-Hélène GUILLEMOT, Zoé Buniazet, and Marjorie Vrignaud. Matériau et procédé pour piéger, détecter et quantifier des composés soufrés volatils, May 2016.

[112] Sabine Crunaire and Thu-Hoa TRAN-THI. Material and method for trapping, detecting and quantifying heterocyclic aromatic compounds and others.

[113] Y. Marcus. *The properties of solvents.* Number v. 4 in Wiley series in solution chemistry. Wiley, Chichester ; New York, 1998.

[114] *ISO 6579 :2002 - Microbiologie des aliments – Méthode horizontale pour la recherche des Salmonella spp.*

[115] J. W. Bridges and R. T. Williams. The fluorescence of indoles and aniline derivatives. *Biochemical Journal*, 107(2) :225–237, March 1968.

[116] Jean-marc Roche and Gilles Zambardi. Reaction medium for methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) bacteria, July 2013.

[117] Surbhi Malhotra-Kumar, Kelly Haccuria, Mindy Michiels, Margareta Ieven, Claire Poyart, Waleria Hryniewicz, Herman Goossens, and MOSAR WP2 Study Team. Current trends in rapid diagnostics for methicillin-resistant Staphylococcus aureus and glycopeptide-resistant enterococcus species. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(5) :1577–1587, May 2008.

[118] Mélinda Maux and Tristan Simonart. Surveillance microbiologique de l'eau. *Techniques de l'ingénieur Bioprocédés dans les domaines de l'énergie et de l'environnement*, base documentaire : TIB161DUO.(ref. article : p4218), 2010.

[119] M. H. McCrady. The Numerical Interpretation of Fermentation-Tube Results. *Journal of Infectious Diseases*, 17(1) :183–212, July 1915.

[120] *ISO 9308-2 :2012 - Qualité de l'eau – Dénombrement des Escherichia coli et des bactéries coliformes – Partie 2 : Méthode du nombre le plus probable.*

[121] *ISO 11866-1 :2005 - Lait et produits laitiers – Dénombrement d'Escherichia coli présumés – Partie 1 : Technique du nombre le plus probable avec utilisation de 4-méthylumbelliféryl-bêta-D-glucuronide (MUG).*

[122] American Society for Microbiology., American Society for Microbiology, D. H. Bergey, and Robert S. Breed. *Bergey's manual of determinative bacteriology,*. Williams & Wilkins Co.„ Baltimore„ 7th ed. edition, 1957.