



**HAL**  
open science

# Elaboration d'un microsystème d'analyse de l'air destiné à la détection rapide d'un développement fongique dans les espaces clos

Yaël Joblin

► **To cite this version:**

Yaël Joblin. Elaboration d'un microsystème d'analyse de l'air destiné à la détection rapide d'un développement fongique dans les espaces clos. Autre. Université Paris-Est, 2011. Français. NNT : 2011PEST1027 . tel-00696618

**HAL Id: tel-00696618**

**<https://theses.hal.science/tel-00696618>**

Submitted on 13 May 2012

**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.

Ecole Doctorale :  
Mathématiques et Sciences et Technologies de l'Information et de la Communication (MSTIC)

THÈSE  
pour obtenir le grade de  
Docteur de l'Université Paris-Est  
Spécialité : Electronique, Optronique et Systèmes

Présentée et soutenue publiquement par

**Yaël JOBLIN**

Le 12 mai 2011

## **Elaboration d'un microsysteme d'analyse de l'air destiné à la détection rapide d'un développement fongique dans les espaces clos**

ELABORATION OF A RAPID AND CONTINUOUS AIR ANALYSING MICROSYSTEM FOR FUNGAL CONTAMINATION DETECTION IN CLOSED SPACES

### **Direction de thèse**

Pr. Tarik BOUROUINA (Directeur) et Pr. Odile PICON (Co-directrice)

### **Jury**

#### **Rapporteurs :**

Dr C. BERGAUD      Directeur de Recherche CNRS - Laboratoire LAAS, UPR 8001  
Pr. P. BOIRON      Professeur de l'université Lyon 1, Faculté de Pharmacie - Institut des sciences pharmaceutiques et biologiques, UMR 5557

#### **Examineurs :**

Pr. T. BOUROUINA    Professeur à ESIEE Paris, Université Paris-Est  
Pr. O. PICON      Professeur à l'université Paris-Est Marne-la-Vallée  
Dr E. ROBINE      Responsable du pôle Recherche et Innovation pour l'Hygiène des Bâtiments – CSTB  
Dr O. FRANÇAIS      Maître de Conférences à l'ENS Cachan - Laboratoire SATIE, CNRS, UMR 8029  
Dr F. BOUSTA      Ingénieur microbiologiste - Laboratoire LRMH  
Pr. D. ANGELESCU    Professeur à ESIEE Paris, Université Paris-Est

#### **Invités :**

Dr S. MOULARAT    Responsable du secteur micro-détection des polluants chimiques et microbiologiques – CSTB  
M. F. GHASSEMI    Ingénieur à ESIEE Paris, Université Paris-Est





A mes grands parents,  
A mes parents,  
A ma femme.

*« Tout le monde savait que c'était impossible à faire. Puis un jour quelqu'un est arrivé qui ne le savait pas, et il l'a fait »*

Winston Churchill



## REMERCIEMENTS

Ce mémoire est l'aboutissement d'un travail de trois années, mais surtout d'une riche expérience humaine et scientifique, partagée avec de nombreuses personnes à qui je voudrais témoigner toute ma reconnaissance à travers ces quelques lignes.

Je voudrais tout d'abord exprimer ma reconnaissance à Messieurs **Jean-Christophe VISIER** et **Christian COCHET**, respectivement chef du département Energie-Santé-Environnement et chef de la division Santé, de m'avoir accueilli au CSTB et pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail.

Je souhaite adresser toute ma gratitude à mes directeurs de thèse, les Professeurs **Tarik BOUROUINA** et **Odile PICON** respectivement Professeur à ESIEE Paris et Professeur de l'université Paris-Est. Je vous remercie pour le soutien et l'aide que vous m'avez apporté tout au long de ce travail. Je souhaite également vous remercier pour la confiance que vous m'avez témoignée en acceptant la direction de cette thèse et en permettant ainsi sa réalisation.

Je profite de cette occasion pour remercier le laboratoire ESYCOM de m'avoir intégré dans son équipe, me permettant ainsi de pouvoir réaliser ce projet.

Mes plus sincères remerciements à Monsieur **Enric ROBINE**, Responsable du pôle Recherche et Innovation pour l'Hygiène des Batiments du CSTB, pour m'avoir accueilli au sein du Laboratoire « Microbiologie des Environnements Intérieurs ». Je tiens également à vous exprimer toute ma reconnaissance pour ces trois années de thèse durant lesquelles votre grande disponibilité, votre rigueur scientifique, votre enthousiasme et vos précieux conseils m'ont permis de travailler dans les meilleures conditions. La confiance que vous m'avez accordée ainsi que nos nombreuses discussions m'ont permis de progresser et de mieux appréhender les différentes facettes du métier de chercheur.

Je vous remercie chaleureusement pour votre soutien et votre sympathie et je n'oublie pas les moments de détente sportifs.

Je remercie tous particulièrement Monsieur **Patrick BOIRON**, Professeur à l'université Lyon 1, qui a accepté de juger ce travail et d'en être rapporteur. Je vous remercie pour vos conseils et vos suggestions qui ont permis l'amélioration de ce manuscrit. Veuillez accepter mes plus sincères remerciements pour votre présence dans ce jury et soyez assurée de tout mon respect et de ma profonde gratitude.

Mes remerciements les plus respectueux vont également à Monsieur **Christian BERGAUD**, Directeur de recherche CNRS du Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes (LAAS), qui m'a fait l'honneur de prendre connaissance de ce travail et d'en être également rapporteur. Je vous remercie également pour vos conseils et vos suggestions. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Je souhaite également exprimer ma gratitude à Monsieur **Dan ANGELESCU**, Professeur à ESIEE Paris pour l'intérêt qu'il a porté à mon travail ainsi que pour ces conseils dans ce projet, notamment lors des phases de réalisation des microcolonnes chromatographiques. Je vous remercie également d'avoir accepté d'être le président de jury lors de ma soutenance de thèse. Soyez assuré de mon plus profond respect.

Je tiens à exprimer mes remerciements à Monsieur **Olivier FRANCAIS**, Maître de Conférences à l'ENS Cachan, qui a accepté d'évaluer mon travail de thèse. Je suis très sensible à l'honneur que vous me faites en acceptant de participer à ce jury de thèse. Soyez assuré de toute ma gratitude.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à Monsieur **Faisl BOUSTA**, Ingénieur microbiologiste au Laboratoire de Recherche des Monuments Historiques (LRMH). Je le remercie sincèrement pour son aide et ses conseils, notamment lors de la première phase de ce projet, qui m'ont permis de mieux appréhender le contexte de ce travail. Je lui exprime également toute ma gratitude pour avoir accepté de participer à ce jury de thèse.

Je profite également de cette occasion pour remercier le LRMH, notamment **Geneviève ORIAL**, pour le soutien et la confiance qu'ils nous ont accordés et pour nous avoir permis de réaliser des prélèvements dans des lieux aussi magnifiques que particuliers et ainsi de valider mes travaux préliminaires au développement du microsysteme.

Je souhaite exprimer toute ma reconnaissance à Monsieur **Farbod GHASSEMI**, Ingénieur du Département Systèmes Electroniques de l'ESIEE Paris pour son aide précieuse concernant les différents aspects de l'intégration électronique du microsysteme. Je te remercie profondément pour le temps que tu m'as consacré, ton soutien dans les moments charnières et tous les conseils prodigués qui m'ont permis de proposer un prototype fonctionnel en conclusion de ce travail. Je t'exprime également ma gratitude pour avoir accepté de participer à ce jury de thèse.

Je profite une nouvelle fois de cette occasion pour remercier les équipes de l'ESIEE Paris, particulièrement **Bruno Mercier** et son équipe pour leur aide précieuse et leur accueil lors de la fabrication en salle blanche des microstructures et **Abdenasser Fakri** pour le temps consacré à nos échanges sur l'intégration électronique du système.

Mes plus sincères remerciements à Monsieur **Stéphane MOULARAT**, responsable du secteur micro-détection de la pollution chimique et microbiologique, pour m'avoir apporté une aide précieuse dans les domaines de la chimie analytique et de la microbiologie, ainsi que pour ses conseils, sa disponibilité, sa patience et ses encouragements tout au long de mon travail de recherche. Je pense que je ne pourrais jamais assez te remercier pour t'exprimer toute ma gratitude tant au niveau scientifique qu'au niveau humain durant chacune des étapes de ce projet. Je te remercie pour avoir accepté de participer à ce jury de thèse mais je sais que tu n'aurais pas voulu manquer cela.

Je souhaiterais exprimer un grand merci tout particulier à **Rukshala ANTON** qui en a vu de toutes les couleurs, mais qui par sa bonne humeur et sa persévérance, est parvenue à me supporter d'abord en tant qu'encadrant, puis comme collègue de bureau. Je te remercie donc sincèrement pour ton aide précieuse, notamment concernant le volet chimie des polymères et pour ton optimisme à toutes épreuves qui m'ont permis de franchir les différentes embuches rencontrées. Je te souhaite également bon courage puisque l'aventure continue (notamment avec ta thèse) mais surtout, parce que tu vas encore devoir me supporter.

Je profite une fois encore de cette occasion pour exprimer mes remerciements aux membres du LPPI pour leurs aides et leurs conseils dans le domaine de la chimie des polymères et pour nous avoir permis, à travers les travaux de Rukshala, de développer les couches sensibles utilisées dans ce projet.

Je tiens ensuite à remercier tous mes collègues qui sont devenus bien plus que ça au cours de ces 3 ans, alors merci les amis :

**Anthony** (allez l'OM), **Carole** (ton tour viendra... un jour tu seras grande), **Catherine** (secrétaire précieuse mais attention aux trombones), **Céline** (spéléologie du GC avec le concours du raleur), **Christelle** (le couteau suisse du laboratoire), **Christophe** (multisport en folie), **Claudine** (redactrice en chef du Webzine), **Clémence** (alias kinder), **Florian** (hie...man ! ton tour viendra aussi), **Isabelle** (Laboratoire 5S et bientôt ton tour), **Jean-paul** (alias biquet), **Maha** (Bonne continuation au Canada), **Malya** (et GunBi), **Marie-cécile** (Bonne continuation du côté de Nantes), **Marina** (Bonne

continuation du côté de Narbonne), **Marjorie** (Docteur micromycète), **Mélanie** (et ?), **Mory** (ton tour viendra également), **Murielle** (le bonheur est dans le pré), **Olivier** (pionnier dans les systèmes capteurs), **Romain** (badminton en folie), **Sébastien** (Mac Gyver version skieur), **Stéphane** (tout schuss...), **Thi-Lan** (et Maïwenn)...

Merci pour vos conseils, vos expériences, votre bonne humeur et votre écoute, qui m'ont aidé au quotidien à réaliser ce travail, pour tous les moments passés ensemble au travail et en dehors. Merci pour l'accueil chaleureux que vous m'avez fait lors de mon arrivée et pour le soutien que vous m'avez apporté tout au long de ma Thèse. En fait, tout simplement Merci pour votre amitié...

Enfin, je ne peux terminer mes remerciements sans une pensée pour les personnes de mon entourage, **ma famille** ainsi que **mes amis** de toujours (ils se reconnaîtront) pour leurs soutiens et encouragements dans les différentes étapes de ma vie qui m'ont menées jusqu'à la rédaction de ce mémoire. Je tiens à leurs témoigner toute ma reconnaissance et toute mon affection pour avoir cru en moi et qu'ils sachent que leur présence m'a été d'une aide précieuse.

Une pensée toute particulière pour ceux qui m'ont mis au monde et qui m'ont toujours soutenu dans mes choix : mes parents qui ont su faire de moi, l'homme que je suis devenu. Je tiens donc à remercier infiniment **ma mère**, partie trop tôt, qui a toujours cru en moi durant mon parcours. Qu'elle sache qu'elle reste près de moi à chacune des étapes de ma vie. Merci infiniment également à **mon père**, pour son soutien au quotidien. Qu'il sache tout le respect et l'amour que je lui porte.

Et je terminerais enfin par un remerciement tout particulier à celle qui m'a fait l'honneur d'accepter de devenir mon épouse depuis bientôt 1 an et qui a été mon plus proche soutien durant ces 3 ans de thèse : Merci infiniment à **ma femme** pour son amour et son soutien au quotidien qui m'ont aidé dans l'accomplissement de ce travail.



**RESUME**

Les champignons sont des biocontaminants courants des environnements intérieurs. De nombreuses études ont démontré leur rôle dans la dégradation des supports que ces microorganismes colonisent tels que les matériaux de construction, les ouvrages ou les œuvres d'art. De plus, ces biocontaminants sont susceptibles d'induire des allergies, des infections, des toxi-infections ou encore des irritations.

Depuis 2005, une technique de détection de la croissance fongique, basée sur la recherche de traceurs chimiques spécifiques dans l'air, et un indice de contamination fongique (ICF), ont été développés et validés au cours de différentes campagnes de mesures dans l'habitat, les bureaux, les écoles, les crèches... L'objectivation d'une croissance fongique dans un environnement s'appuie sur des prélèvements par adsorption, une analyse chromatographique au laboratoire (GC/MS) et le calcul de l'ICF.

Dans le cadre de la surveillance de la qualité microbiologique de l'air des environnements intérieurs, cette thèse a pour ambition de prolonger ces travaux en développant notamment un système de microcapteurs chimiques adapté à la mesure *in situ*.

Cette recherche repose à la fois sur la méthode de détection fongique développée au CSTB et sur l'expertise scientifique et technique de l'ESIEE en matière de miniaturisation d'instruments de mesure, grâce à l'apport des microtechnologies.

Le premier axe de cette étude a consisté à identifier expérimentalement les COV du métabolisme fongique spécifiques d'un développement sur des matériaux du patrimoine. Ces molécules ont permis de consolider l'ICF et de définir deux indices spécifiques à la problématique des sites patrimoniaux, validés dans des châteaux, musées, bibliothèques, grottes ornées...

Le second axe porte, d'une part, sur la conception et caractérisation des briques élémentaires du microsystème, à savoir un module de préconcentration (adsorption TENAX), un module de séparation (microGC) et un module de détection (capteurs polymères) et d'autre part sur les intégrations et pilotage de ces briques.

**Mots clés :** Développement fongique, indice, COV, préservation du patrimoine, qualité de l'air intérieur, microsystème d'analyse, capteurs chimiques, polymères conducteurs, chromatographie en phase gazeuse.



**ABSTRACT**

*Fungi* are common microbial contaminants of indoor environments. Many studies have demonstrated their role in the partial or total degradation of materials they colonize such as building materials, or works of art. Moreover, those microbial contaminants are likely to lead to allergies, infections, poisoning or irritation.

Since 2005, a new technique based on researching specific chemical tracers in the air, was developed and validated during different measurement campaigns.

This approach is now applied to various indoor environments (houses, offices, schools, child care centers...) and allows the detection of recent and/or hidden contamination.

The purpose of this work is to study and characterize a rapid and continuous air analysing microsystem for detection of fungal contamination in closed spaces.

This study falls within the field of monitoring air microbiological quality in indoor environments. In addition to the time saved by the absence of any laboratory analysis, this system must provide a permanent monitoring of environments frequented by people, such as museums, schools, hospitals....

This research is based both on the fungal detection method developed by CSTB and on scientific and technical expertise of ESIEE: specialised in design and manufacturing of miniaturized analysis systems obtained using microtechnology.

The first step of this study was to define the compounds' nature to be detected for different cases of contamination along with the sampling strategy for the system. The second step focuses on the microstructures design and fabrication to be used in microanalytical system based on gas chromatography and the development of a miniaturised analysis system.

So the first part of the study consisted in defining specific fungal contamination tracers for heritage conservation sites. This list allowed to reinforce a fungal contamination index for indoor environments and to define two specific indexes designed for heritage conservation sites.

The validation of these different indexes allowed checking their compliance with those types of environments (castles, museums, libraries, decorated caves...) by detecting all cases of contamination, along with the control remediation of former contaminated environments.

The second part of the study enabled the design and validation of three main modules constitutive of the microanalytical system based on gas chromatography. A miniaturised analysis system based on three modules has been developed.

**Keywords:** Fungal development, index, VOC, heritage conservation, indoor air quality, micro analytical system, chemical sensors, conducting polymers, gas chromatography.

**TABLE DES MATIERES**

<b>INTRODUCTION</b>	<b>17</b>
<b>PREMIERE PARTIE : DETECTION DE CONTAMINATIONS FONGIQUES DANS LES ENVIRONNEMENTS INTERIEURS</b>	<b>21</b>
<b>CHAPITRE I : ETAT DE L'ART</b>	<b>23</b>
<b>I Les moisissures des environnements intérieurs.....</b>	<b>23</b>
I.1 Eléments de définition .....	23
I.2 Colonisation des environnements intérieurs .....	24
I.2.A Les étapes et facteurs influençant la croissance	24
I.2.B Principales espèces fongiques isolées	27
I.3 Conséquences sanitaires .....	27
I.3.A L'aspergillose invasive nosocomiale.	27
I.3.B Les maladies immuno-allergiques.	28
I.3.C Les toxi-infections.	28
I.3.D Effets irritatifs.	29
<b>II Surveillance et diagnostic des contaminations fongiques dans les environnements intérieurs : approches analytiques .....</b>	<b>30</b>
II.1 Inspection des locaux .....	30
II.2 Mesure des Champignons microscopiques .....	30
II.2.A Echantillonnage	30
II.2.B Analyses	34
II.3 Détection du développement fongique par les COV.....	35
II.3.A Emissions fongiques	35
II.3.B Mesure des COV dans les espaces clos	37
II.3.C Recherche d'une empreinte chimique spécifique	38
<b>CHAPITRE II : RECHERCHE DE TRACEURS ADAPTES A LA SURVEILLANCE DES SITES PATRIMONIAUX</b>	<b>41</b>
<b>I Matériels et méthodes .....</b>	<b>41</b>
I.1 Souches.....	41

I.2 Supports de croissance.....	42
I.3 Chambres d'émission .....	43
I.4 Procédure de contamination .....	44
I.5 Echantillonnage et analyse .....	45
<b>II Résultats.....</b>	<b>48</b>
II.1 Caractérisation du montage expérimental .....	48
II.1.A Mesure du blanc de chambre	48
II.1.B Caractérisation des conditions de température et humidité	49
II.2 Emissions chimiques des produits de construction .....	49
II.3 Emissions chimiques d'origine fongique .....	50
II.3.A Démarche analytique	50
II.3.B Recherche des traceurs spécifiques aux substrats	52
<b>III Discussion.....</b>	<b>55</b>
III.1 Renforcement de l'indice et traceurs des substrats contaminés.....	55
III.2 Définition d'indices spécifiques .....	55
<b>CHAPITRE III : STRATEGIE D'ECHANTILLONNAGE ET DETECTION DES</b>	
<b>TRACEURS IN SITU</b>	<b>57</b>
<b>I Matériel et méthodes .....</b>	<b>57</b>
I.1 Echantillonnage .....	57
I.2 Analyse .....	57
<b>II Résultats.....</b>	<b>59</b>
II.1 Stratégie d'échantillonnage .....	59
II.1.A Diffusion d'un composé cible	59
II.1.B Diffusion des traceurs fongiques	61
II.2 Validation des indices .....	64
II.2.A Description des sites investigués	64
II.2.B Application des indices pour des environnements non contaminés	69
II.2.C Application des indices pour des environnements contaminés	70
II.2.D Application des indices pour des environnements anciennement contaminés	71
<b>III Discussion.....</b>	<b>72</b>

<b>DEUXIEME PARTIE : CONCEPTION D'UN MICROSYSTEME DEDIE A</b>	
<b>L'ANALYSE DE COV CIBLES</b>	<b>75</b>
<b>CHAPITRE I : ETAT DE L'ART</b>	<b>77</b>
<b>I Les capteurs : principes généraux et définition.....</b>	<b>77</b>
I.1 Définition et performances .....	77
I.2 Description des Principaux capteurs de gaz .....	79
I.2.A Capteurs électrochimiques	80
I.2.B Capteurs résonnants	83
I.2.C Capteurs optiques	86
I.3 L'approche multi capteurs .....	86
I.4 Systèmes dédiés au monde microbiologique.....	89
<b>II Microstructures dédiées à la métrologie des gaz.....</b>	<b>93</b>
II.1 Microstructures d'échantillonnage : préconcentrateurs .....	94
II.2 Microstructures de séparation .....	97
<b>III Conception de microsystèmes .....</b>	<b>102</b>
III.1 Matériaux de fabrication .....	102
III.2 Lithographie .....	103
III.3 Procédés de micro-usinage.....	104
III.3.A Gravure humide	105
III.3.B Gravure sèche	106
III.4 Techniques de « collages » .....	108
III.4.A Soudure anodique silicium-verre	108
III.4.B Soudure par fusion silicium-silicium	108
<b>CHAPITRE II : RECHERCHE DES COUCHES SENSIBLES DEDIEES A LA</b>	
<b>DETECTION DE COV D'ORIGINE FONGIQUE</b>	<b>109</b>
<b>I Méthodes expérimentales.....</b>	<b>110</b>
I.1 Dispositif expérimental pour capteurs polymères .....	110
I.1.A Système d'acquisition de données	110

I.1.B Dépôt de couche polymères	112
<b>I.2 Matériel chimique et biologique</b>	<b>113</b>
I.2.A Matériel chimique	113
I.2.B Matériel biologique	113
<b>I.3 Chambres d'émissions et supports de croissance</b>	<b>114</b>
I.3.A Chambres d'émissions contenant des standards chimiques	114
I.3.B Chambres d'émissions contenant des souches fongiques	114
<b>II Caractérisation des couches sensibles</b>	<b>115</b>
II.1 Différenciation d'ambiances par des capteurs polymères	115
II.1.A Caractérisation à partir de souches fongiques	115
II.1.B Caractérisation à partir de traceurs cibles	122
<b>III Discussion sur les couches sensibles</b>	<b>123</b>
<b>CHAPITRE III : CONCEPTION DES MICROMODULES DU SYSTEME</b>	
<b>D'ANALYSE</b>	<b>127</b>
<b>I Matériels et méthodes</b>	<b>128</b>
I.1 Matériel biologique et support de croissance	128
I.2 Chambres d'émissions de COV spécifiques	128
I.3 Echantillonnage et analyses des COV	129
I.3.A Echantillonnage des COV	129
I.3.B Description des chaînes analytiques	130
I.4 Dispositifs de validation des modules	132
I.4.A Module de préconcentration	132
I.4.B Module de séparation	133
<b>II Développement des modules du système</b>	<b>134</b>
II.1 Procédé de fabrication des modules de prétraitement	134
II.1.A Eléments constitutifs de micromodules	134
II.1.B Conception de masques	135
II.1.C Procédé de fabrication	139
II.1.D Connexions microfluidiques	143
II.2 Contraintes expérimentales et observations	143
II.3 Procédé de fonctionnalisation des modules	145
II.3.A Microstructure de séparation	145
II.3.B Microstructure de concentration.	151
II.4 Procédé de fabrication du module de détection	153

II.4.A Electrodes interdigitées	154
II.4.B Chambre de confinement	156
II.4.C Traitement de l'information	157
II.5 Caractérisation des modules .....	160
II.5.A Module de concentration de l'échantillon	160
II.5.B Module de séparation de l'échantillon	162
II.5.C Caractérisation du module de détection	168
<b>III Discussion sur les micromodules du système d'analyse.....</b>	<b>170</b>
<b>CHAPITRE IV : ELABORATION DU MICROSYSTEME D'ANALYSE</b>	<b>173</b>
<b>I Interface de commande du système d'analyse.....</b>	<b>173</b>
I.1 Architecture du système d'analyse .....	173
I.1.A Principe du système d'analyse	173
I.1.B Description des étapes d'analyse	174
I.1.C Description des éléments constitutifs du prototype	175
I.2 Outils de pilotage du système .....	178
I.2.A Génération de signaux de commande	178
I.2.B Contrôle des éléments du système	181
I.2.C Conception de la carte	183
I.3 Interface utilisateur .....	185
I.3.A Organigramme de fonctionnement	185
I.3.B Conception de l'interface utilisateur	187
<b>II Caractérisation du système d'analyse.....</b>	<b>189</b>
II.1 Assemblage du système.....	189
II.2 Caractérisation des paramètres de fonctionnement du système .....	189
II.2.A Caractérisation des débits	189
II.2.B Caractérisation des rampes de température	191
<b>III Discussion sur le microsysteme d'analyse.....</b>	<b>193</b>
<b>DISCUSSION GENERALE</b>	<b>195</b>
<b>CONCLUSION GENERALE</b>	<b>199</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>203</b>
<b>ANNEXES</b>	<b>227</b>



**FIGURES****PREMIERE PARTIE**

Figure I-1 : Classification simplifiée du règne Fungi (Chasseur et Nolard, 2003).....	23
Figure I-2 : Observation microscopique d'une moisissure ( <i>Penicillium spinulosum</i> ) photographie LMEI CSTB .....	24
Figure I-3 : Cycle de vie asexuel d' <i>Aspergillus nidulans</i> (d'après Osharov et May, 2001; Moularat, 2005) .....	24
Figure I-4 : Schéma du principe de l'impaction en milieu solide. D'après Renoux et Boulaud, 1998.....	31
Figure I-5 : Schéma du principe de l'impaction en milieu liquide. D'après Buttner et al., 1997.....	32
Figure I-6 : Représentation schématique de l'efficacité d'un filtre en fonction de la dimension des particules et des différents régimes de diffusion. D'après Renoux et Boulaud, 1998.....	33
Figure I-7 : Emissions fongiques durant les phases de croissance d'une moisissure. D'après Moularat, 2005. ....	36
Figure I-8 : Chemin métabolique de la biosynthèse des principaux COV et mycotoxines associées (d'après Pasanen et al., 1996; Moularat, 2005).....	37
Figure I-9 : Incrémentation de l'indice chimique de contamination fongique (Moularat, 2007).....	39
Figure II-1 : Photographies des souches de l'étude cultivant sur milieu S10.....	42
Figure II-2 : Photographies des supports de croissance identifiés par le LRMH.....	43
Figure II-3 : Photographie d'une chambre d'émission .....	44
Figure II-4 : Photographie d'une chambre d'émission sur le support modèle (contaminée par <i>P.</i> <i>brevicompactum</i> et témoin).....	45
Figure II-5 : Schéma de principe et photographie du montage expérimental .....	46
Figure II-6 : Chromatogramme d'un blanc de chambre.....	48
Figure II-7 : Superposition de 3 chromatogrammes issus de fibre de verre contaminée par <i>Penicillium</i> ..	48
Figure II-8 : Conditions d'humidité et température mesurées à l'intérieur d'une chambre d'émission ....	49
Figure II-9 : Chromatogrammes superposés des émissions du lin sans (tracé noir) et avec développement d' <i>Aspergillus sydowii</i> (tracé rouge). ....	51
Figure II-10 : Agrandissement du chromatogramme Figure II-9 pris entre 7,5-22,5 min en abscisse et 0- 100 kcounts en ordonnée .....	51
Figure III-1 : Photographie du système de prélèvement actif (pompe et tube Tenax).....	57
Figure III-2 : Photographie et schéma de principe d'un corps diffusif Radiello.....	57
Figure III-3 : Photographies des salles investiguées au château de Champs-sur-Marne.....	59
Figure III-4 : Schéma des points de prélèvements au château de Champs-sur-Marne .....	60
Figure III-5 : Photographies lors de la campagne de mesures effectuée à la médiathèque de Château- Thierry .....	61
Figure III-6 : Photographie et Schéma des points de prélèvement à 1,5 m (A, B, C), au plafond (B, C) et au sol (C) dans la médiathèque de Château-Thierry.....	62
Figure III-7 : Photographies lors de la campagne de mesures effectuée à la bibliothèque privée du château d'Escorpain.....	63
Figure III-8 : Photographie et Schéma des points de prélèvement à 1 m (A, B, C) dans la Bibliothèque privée du château d'Escorpain .....	63
Figure III-9 : Photographies lors de la campagne de mesures effectuée au musée du Louvre.....	64
Figure III-10 : Photographie et Schéma des points de prélèvement (A, B, C) dans la salle des états du musée du Louvre (Paris).....	65
Figure III-11 : Photographie et Schéma des points de prélèvement à 1,3 m dans la salle Percier et fontaine et à 0,3 m dans le salon carré du musée du Louvre (Paris) .....	65
Figure III-12 : Photographies lors de la campagne de mesures effectuée au musée des arts décoratifs ....	66
Figure III-13 : Photographies lors de la campagne de mesures effectuée au château de Fontainebleau ....	67
Figure III-14 : Photographies lors de la campagne de mesures effectuée à la grotte de Lascaux.....	68



## SECONDE PARTIE

Figure I-1 : Capteur à couche épaisse à base de poudre de SnO <sub>2</sub> frittée ( <a href="http://www.figarosensor.com">http://www.figarosensor.com</a> )... 81	81
Figure I-2 : Schéma de principe et photographie d'un capteur oxyde métallique à couche mince ( <a href="http://www.microsens.ch">http://www.microsens.ch</a> )..... 81	81
Figure I-3 : Schéma de principe d'un capteur à polymère conducteur et photographie de capteurs polymères conducteurs sur électrode simple (source ctib-tchn) (a) et sur électrodes interdigitées spirales (Li et al., 2007a) (b) ..... 83	83
Figure I-4 : Schéma de principe d'un capteur chimique à effet de champ ..... 83	83
Figure I-5 : Schéma de principe et photographie d'un capteur Microbalances à Cristal de Quartz (source ctib-tchn)..... 84	84
Figure I-6 : Schéma de principe d'un capteur à ondes acoustiques de surfaces..... 85	85
Figure I-7 : Schéma de principe et photographie d'une puce composée de capteur Micropoutres ( <a href="http://www.fondation.eads.net">http://www.fondation.eads.net</a> ) ..... 85	85
Figure I-8 : Similitude entre l'analyse sensorielle et l'analyse multi-capteurs (Göpel, 1998; Turner et Magan, 2004) ..... 88	88
Figure I-9 : Récapitulatif des méthodes de reconnaissance de forme (Modifié de (Pearce, 1997; Ramalho, 1999; Gardner et Bartlett, 2000a)..... 89	89
Figure I-10 : Représentation du Micropréconcentrateur (Tian et al., 2005) ..... 96	96
Figure I-11 : Exemples de réalisation de microstructures de préconcentration..... 97	97
Figure I-12 : Photographie du microsystème chromatographique proposé par Terry et al. .... 98	98
Figure I-13 : Réalisation de microcolonnes chromatographiques proposées par le laboratoire Sandia - MicroChemLab ..... 100	100
Figure I-14 : Images des réalisations de microcolonnes chromatographiques proposées dans les études de Potkay et al. et Agah et al. .... 101	101
Figure I-15 : Réalisation de microstructures composant un microsystème d'analyse de mélange gazeux proposé par Zellers et al. .... 102	102
Figure I-16 : Maille élémentaire et plans cristallins du Silicium (Permuy et al., 2004) ..... 103	103
Figure I-17 : Schématisation des différentes étapes de lithographie (modifié de(Charlot, 2002) ..... 104	104
Figure I-18 : Profils de gravure envisageables par gravure humide isotrope..... 105	105
Figure I-19 : Structures envisageables par gravure humide anisotrope ..... 106	106
Figure I-20 : Profils de gravure envisageables par gravure sèche ..... 107	107
Figure I-21 : Schéma des différentes possibilités de collage : soudure anodique (a) et (b), soudure par fusion (c) (Charlot, 2002)..... 108	108
Figure II-1 : Photographie du système d'acquisition ..... 110	110
Figure II-2 : Photographie de l'électrovanne et de la chambre PTFE ..... 111	111
Figure II-3 : Photographie de la matrice de capteurs polymères..... 111	111
Figure II-4 : Photographies des souches de l'étude cultivant sur milieu S10..... 114	114
Figure II-5 : Structure chimique du PEDOT-PSS ..... 115	115
Figure II-6 : Structure chimique du COPO (biFI-EDOT-Cz)..... 116	116
Figure II-7 : Structure chimique du Polypyrrole + perchlorate de lithium ..... 116	116
Figure II-8: Comparaison du comportement de capteurs polymère entre ambiances stériles et contaminées ..... 117	117
Figure II-9: Comparaison du comportement de capteurs polymère entre ambiances stérile et contaminées ..... 117	117
Figure II-10 : Comparaison du comportement de l'unité bifluorène dibromé entre une ambiance stérile et contaminée ..... 119	119
Figure II-11 : Structures chimiques avec modification du contre-ion du polypyrrole ..... 120	120
Figure II-12 : Comparaison du comportement du polypyrrole + octane sulfonate entre une ambiance stérile et contaminée..... 120	120
Figure II-13 : Comportement de l'unité bifluorène dibromé en présence d'eau et/ou alcool ..... 122	122
Figure II-14 : Comportement du polypyrrole dopé avec l'octane sulfonate en présence d'eau et/ou alcool ..... 122	122
Figure III-1 : Photographie d'un tube Tenax ..... 130	130
Figure III-2 : Chambre contenant un vial de prélèvement..... 130	130
Figure III-3 : Photographie du banc d'analyse de chromatographie en phase gazeuse avec la microcolonne ..... 133	133
Figure III-4 : Connecteurs fluidiques commerciaux..... 134	134
Figure III-5 : Représentation des motifs d'alignements ..... 137	137

Figure III-6 : Représentation des 3 niveaux de masque pour la réalisation d'une microcolonne chromatographique.....	137
Figure III-7 : Représentation des 3 niveaux de masque pour la réalisation d'une microstructure de préconcentration .....	139
Figure III-8 : Représentation schématique du procédé de fabrication des micromodules.....	140
Figure III-9 : Observation de la gravure par DRIE des micropiliers.....	144
Figure III-10 : Photographie des microcanaux réalisés.....	145
Figure III-11 : Photographie du montage pour le remplissage de la colonne.....	147
Figure III-12 : Observation d'un ménisque lors de la déconnexion du tube .....	148
Figure III-13 : Schéma et photographie du montage pour l'évaporation du solvant.....	148
Figure III-14 : Schéma descriptif de l'évaporation d'un fluide dans un canal.....	149
Figure III-15 : Progression du ménisque à travers la microcolonne .....	150
Figure III-16 : Photographie de la microstructure de séparation.....	151
Figure III-17 : Photographie du montage de fonctionnalisation du préconcentrateur.....	152
Figure III-18 : Photographie de la destruction d'un mur (a) et d'une fissure (b) .....	152
Figure III-19 : Présence d'une fibre dans un canal du préconcentrateur.....	153
Figure III-20 : Photographie de la microstructure de concentration .....	153
Figure III-21 : Représentation schématique du procédé de fabrication des électrodes interdigitées .....	154
Figure III-22 : Représentation du masque pour la réalisation des puces contenant les électrodes interdigitées .....	155
Figure III-23 : Plan de fabrication de la chambre de confinement.....	156
Figure III-24 : Photographie de la chambre de confinement des capteurs polymères.....	157
Figure III-25 : Schéma d'un montage « Pont de Wheatstone ».....	158
Figure III-26 : Schéma d'un montage amplificateur .....	158
Figure III-27 : Montage de traitement des informations des capteurs.....	159
Figure III-28 : Photographie de la carte de traitement des signaux des capteurs.....	160
Figure III-29 : Chromatogramme obtenu à partir de la solution mère contenant les 8 traceurs (Chaîne Hewlett Packard - mode SCAN) .....	160
Figure III-30 : Chromatogramme des émissions de la chambre contenant les 8 traceurs (Chaîne Hewlett Packard - mode SCAN) .....	161
Figure III-31 : Chromatogramme des émissions de la chambre contenant de la toile de verre contaminée par <i>Aspergillus niger</i> (Chaîne Hewlett Packard - mode SCAN).....	161
Figure III-32 : Chromatogramme des émissions de la chambre contenant les 8 traceurs (Chaîne Hewlett Packard - mode SIM).....	161
Figure III-33 : Chromatogramme des émissions de la chambre contenant de la toile de verre contaminée par <i>Aspergillus niger</i> (Chaîne Hewlett Packard - mode SIM) .....	162
Figure III-34 : Chromatogramme d'un tube contenant les 8 traceurs (Chaîne Perkin-Elmer).....	162
Figure III-35 : Chromatogramme de l'air prélevé dans une chambre témoin (Perkin-Elmer) .....	163
Figure III-36 : Spectre de masse de l'alpha-pinène.....	163
Figure III-37 : Chromatogramme de l'air prélevé dans une chambre contaminée par <i>Aspergillus niger</i> (Perkin-Elmer) .....	163
Figure III-38 : Spectre de masse du 3-heptanol.....	164
Figure III-39 : Spectre de masse du 2-éthylhexanol.....	164
Figure III-40 : Chromatogramme des émissions de la chambre contenant les 8 traceurs (Perkin-Elmer) .....	164
Figure III-41 : Analyse du pic s'étendant de 0,2 à 0,92 min (Perkin-Elmer).....	165
Figure III-42 : Chromatogramme obtenu à partir de l'injection de 5 µL de la solution mère contenant 8 traceurs dans de l'éthanol (HP) .....	165
Figure III-43 : Chromatogramme de l'air prélevé dans une chambre témoin (Perkin-Elmer) .....	166
Figure III-44 : Chromatogramme de l'air prélevé dans une chambre contaminée par <i>Aspergillus niger</i> (Perkin-Elmer) .....	166
Figure III-45 : Spectre de masse du 2-éthylhexanol.....	166
Figure III-46 : Superposition de 4 chromatogrammes obtenus à partir d'air prélevé dans des chambres contenant de la toile de verre contaminée par <i>Aspergillus niger</i> .....	167
Figure III-47 : Evolution de la résistivité du capteur pour une exposition d'une durée de 5 secondes aux différents traceurs .....	169
Figure IV-1 : Schéma de principe du système d'analyse .....	174
Figure IV-2 : Représentation schématique des états des éléments du système d'analyse.....	175
Figure IV-3 : Caractéristiques des pompes du système .....	176
Figure IV-4 : Photographie du montage avec les éléments chauffants.....	176
Figure IV-5 : Photographie et diagramme de fonctionnement du régulateur de température .....	177

Figure IV-6 : Représentation des électrovannes du système .....	178
Figure IV-7 : Représentation du système de communication National Instrument.....	179
Figure IV-8 : Photographie de la carte ACTEL.....	180
Figure IV-9 : Génération des signaux de commande .....	181
Figure IV-10 : Contrôle des électrovannes.....	182
Figure IV-11 : Contrôle des résistances chauffantes.....	182
Figure IV-12 : Contrôle des pompes.....	183
Figure IV-13 : Génération des alimentations de la carte de commande .....	183
Figure IV-14 : Photographie de la carte de commande .....	184
Figure IV-15 : Exemple de décodage par la carte ACTEL en fonction d'un état du système.....	184
Figure IV-16 : Organigramme de fonctionnement du système d'analyse.....	186
Figure IV-17 : Présentation de l'interface utilisateur .....	188
Figure IV-18 : Photographie du prototype du système d'analyse.....	189
Figure IV-19 : Mesure des débits dans la chaîne d'analyse.....	190
Figure IV-20 : Mesure du débit de prélèvement .....	190
Figure IV-21 : Mesure des débits d'analyse.....	191
Figure IV-22 : Rampe de température de la microstructure de concentration .....	191
Figure IV-23 : Rampe de température de la microstructure de séparation.....	192
Figure IV-24 : Principe d'un banc d'analyse par chromatographie .....	235
Figure IV-25 : Séparation des molécules par leurs temps de rétention.....	235
Figure IV-26 : a. Pics mal séparés. b. Pics séparés par changement de la phase stationnaire. c. Pics séparés par l'emploi d'une colonne plus efficace (Serpinet, 1995b) .....	236
Figure IV-27 : Paramètres expérimentaux d'un pic chromatographique supposé gaussien (Serpinet, 1995b).....	236
Figure IV-28 : Courbe représentative de l'équation de Golay .....	238

**TABLEAUX****PREMIERE PARTIE**

Tableau I-1 : Valeur d'incrémentation de l'indice de contamination pour chaque COV du métabolisme (modifier de Moularat, 2007) .....	39
Tableau II-1 : Caractéristiques de la chaîne analytique GC/MS .....	47
Tableau II-2 : 10 COV majoritaires émis par chaque support en l'absence de contamination fongique (l'ensemble des essais est réalisé en triplicata) .....	50
Tableau II-3 : Identification des composés spécifiques issus du lin contaminé par <i>Aspergillus sydowii</i> , <i>Penicillium solitum</i> , <i>Penicillium brevicompactum</i> , <i>Trichoderma komingii</i> et <i>Ulocladium alternariae</i> .....	52
Tableau II-4 : Identification des composés spécifiques de la colle peau de lapin contaminée par <i>Penicillium brevicompactum</i> et <i>Penicillium corylophilum</i> .....	52
Tableau II-5 : Identification des composés du métabolisme fongique spécifiques de l'argile de Lascaux contaminée par <i>Fusarium solani</i> .....	52
Tableau II-6 : Identification des composés du métabolisme fongique spécifiques de l'hêtre contaminé par <i>Phellinus megaloporus</i> .....	53
Tableau II-7 : Construction de l'Indice de Contamination Fongique renforcé par les nouveaux composés* du métabolisme détectés par croissance des champignons sur FV, Lin et colle (les composés indépendants de l'espèce et du substrat sont surlignés en bleu, les composés dont une autre source que fongique est connue sont surlignés en vert, les composés dépendants de l'espèce et/ou du support ne sont pas surlignés) .....	54
Tableau II-8 : Valeur d'incrémentation de l'indice de contamination spécifique au développement de <i>F. Solani</i> sur l'argile de Lascaux (« Indice Lascaux ») .....	56
Tableau II-9 : Valeur d'incrémentation de l'indice de contamination spécifique au développement de <i>P. megaloporus</i> sur l'hêtre (« Indice Phellinus ») .....	56
Tableau III-1 : Caractéristiques des chaînes analytiques GC/MS .....	58
Tableau III-2 : Conditions de prélèvement dans le château de Champs-sur-Marne .....	60
Tableau III-3 : Résultats des mesures de concentration du traceur dans les différentes pièces .....	60
Tableau III-4 : Conditions de prélèvement dans le magasin de la Médiathèque de Château-Thierry et présence des COV du métabolisme (un signe + indique la présence du composé ; un signe – indique son absence) .....	62
Tableau III-5 : Présence des COV du métabolisme en fonction des points de prélèvement (un signe + indique la présence du composé ; un signe – indique son absence) .....	63
Tableau III-6 : Conditions de prélèvement de la salle des états .....	65
Tableau III-7 : Synthèse des états de contamination selon la salle et le site investigué .....	69
Tableau III-8 : Réponse des indices pour des environnements non contaminés .....	70
Tableau III-9 : Réponse des indices pour des environnements contaminés .....	70
Tableau III-10 : Réponse des indices pour des environnements anciennement contaminés .....	71
Tableau III-11 : Réponse des indices sur le site de Lascaux avant et après traitement d'une contamination par <i>Fusarium solani</i> .....	71

SECONDE PARTIE

Tableau I-1 : Familles de capteurs et principes de transduction .....	80
Tableau I-2 : Etudes traitant de la détection microbiologique en utilisant des systèmes multi-capteurs....	91
Tableau II-1 : Liste des polymères conducteurs testés.....	112
Tableau II-2 : Liste des standards pour les essais avec les capteurs polymères .....	113
Tableau II-3 : Analyse de variance des séries de différence fractionnelle de résistance issues d'environnements stérils et contaminés. ....	121
Tableau III-1 : Liste des standards pour la validation des modules de prétraitement .....	129
Tableau III-2 : Caractéristiques du GC/MS Perkin Elmer .....	131
Tableau III-3 : Caractéristiques du GC/MS Hewlett Packard .....	131
Tableau III-4 : Caractéristiques des prélèvements .....	132
Tableau III-5 : Caractéristiques géométriques (en $\mu\text{m}$ ) de la puce microcolonne .....	136
Tableau III-6 : Caractéristiques géométriques (en $\mu\text{m}$ ) de la puce de préconcentration .....	138
Tableau III-7 : Caractéristiques géométriques (en $\mu\text{m}$ ) des électrodes .....	155
Tableau III-8 : Concentration des COV émis lors du développement d' <i>Aspergillus niger</i> sur la toile de verre. ....	167
Tableau IV-1 : Etats des éléments du système en fonction de l'étape d'analyse .....	175
Tableau IV-2 : Caractéristiques des réchauffeurs mica .....	177
Tableau IV-3 : Table de commutation des électrovannes.....	178
Tableau IV-4 : Etat du bus de commande en fonction de l'étape d'analyse .....	180
Tableau IV-5 : Table de commande du système.....	187

**GLOSSAIRE**

AES	Spectroscopie d'Emission Atomique
ANN	Réseaux de Neurones Artificiels
BAW	Bulk Acoustic Wave
CA	Analyse des Clusters
COV	Composé Organique Volatil
COVm	Composé Organique Volatil d'origine microbienne
CSTB	Centre Scientifique et Technique du Bâtiment
DRIE	Deep Reactive Ion Etching
EIA	Enzyme Immuno Assay
EPS	Polysaccharides extracellulaires
GC	Chromatographie en phase gazeuse
ICF	Indice de contamination fongique
LAL	Limulus Amebocyte Lysate
LD	Limite de détection
LDA	Analyses Discriminantes Linéaire
LPCVD	Low Pressure Chemical Vapor Deposition
LRMH	Laboratoire de Recherche des Monuments Historiques
MEMS	Micro-Electro-Mechanical Systems
MNHN	Muséum National d'Histoire Naturelle
MOSFET	Metal Oxide Semiconductor Field Effect Transistor
MS	Spectrométrie de masse
ODTS	Syndrome Toxique des Poussières Organiques - Organic Dust Toxicity Syndrome
PBT	Polybutylène téréphtalate
PCA	Analyses par Composantes Principales
PCRq	Polymerase Chain Reaction quantitative
PDMS	Polydiméthylsiloxane
PECVD	Plasma Enhanced Chemical Vapor Deposition
PEEK	Poly Ether Ether Ketone
PTFE	Polytétrafluoroéthylène (Téflon®)
QCM	Microbalances à Cristal de Quartz
QDA	Analyses Discriminantes Quadratique
RIE	Reactive Ion Etching
SAW	ondes acoustiques de surfaces
SBS	Syndrome des Bâtiments Malsains - Sick Building Syndrome
uma	unité de masse atomique



## INTRODUCTION

L'individu des sociétés industrialisées passe plus de 90 % de son temps dans des espaces clos où il se trouve exposé à de multiples polluants de natures physique, chimique et biologique. Conscients des risques sanitaires potentiellement induits par cette pollution complexe, les pouvoirs publics ont introduit, dans le code de l'environnement du Grenelle 2, le principe de surveillance de la qualité de l'air des environnements intérieurs. Ce principe comprend la mise en place de systèmes de mesure et d'information dans les établissements accueillant des personnes vulnérables (enfants, personnes âgées...), et dans les lieux recevant du public (écoles, transports, musées ....).

Parmi les biocontaminants de ces environnements, les micromycètes (moisissures) constituent un axe de recherche pour de nombreuses équipes à travers le monde (Amérique du Nord, pays d'Europe du Nord, Belgique, Italie, Australie, France...). Ainsi, comme le rappelle l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) dans son rapport paru en 2009 « WHO guidelines for indoor air quality : dampness and mould », les moisissures sont susceptibles d'induire des allergies, des infections, des toxi-infections ou encore des irritations. Outre leur impact sanitaire, ces microorganismes peuvent agir sur la structure même des bâtiments, altérant irrémédiablement produits de construction et de décoration, phénomène largement redouté notamment par les conservateurs du patrimoine.

L'intérêt pour ces microorganismes est exacerbé par le constat que de nombreux logements des pays industrialisés sont concernés par des problèmes d'humidité et/ou de moisissures. Ainsi, des études basées sur des questionnaires ou inspections visuelles montrent une proportion très importante de logements contaminés. Des études européennes rapportent ainsi que la proportion de logements présentant des moisissures visibles peut atteindre 25 % (Brunekreef, 1992; Pirhonen, 1996). Des études réalisées en Amérique du Nord font, quant à elles, état de taux de contamination variant entre 14 et 38 % (Dales, 1991). Cette proportion atteint 80 % lorsque sont prises en compte les habitations avec une forte humidité détectée dans les murs (Miller, 1988; Koskinen, 1999).

En France, les pouvoirs publics subventionnent un Observatoire de la Qualité de l'Air intérieur (OQAI) piloté par le Centre Scientifique et Technique du Bâtiment (CSTB). Les résultats de la campagne nationale logements réalisée par l'OQAI, publiés fin 2007, dressent le premier état de la qualité de l'air des habitations françaises. Cette campagne de mesures révèle notamment que la contamination des logements par les moisissures concerne une proportion importante des foyers français avec des valeurs comprises entre 37 et 42 % dont 2 % (soit plus de 610 000 logements) présentaient des surfaces contaminées de plus de 1 m<sup>2</sup> (Moularat, 2008).

Dans ce contexte, le Laboratoire de Microbiologie des Environnements Intérieurs (LMEI) du CSTB, structure d'accueil pendant mon doctorat, a engagé depuis plus de 10 ans diverses actions de recherche notamment sur la maîtrise du développement de moisissures sur les supports et sur la détection précoce de leur croissance.

Traditionnellement, la contamination fongique d'un environnement est objectivée par son examen visuel ou par la culture des microorganismes présents dans l'air, sur les surfaces ou dans les poussières. De ce fait, les méthodes usuelles permettent rarement de détecter les contaminations cachées (croissance derrière une cloison, dans la structure du bâti ou dans des systèmes de ventilation par exemple) ou récentes pour lesquelles aucun signe de développement n'est apparent.



Dans une optique de détection précoce d'un développement fongique, les travaux du LMEI s'appuient sur l'émission, dès les premières heures du développement fongique, de Composés Organiques Volatils d'origine microbienne (COVm) spécifiques, qui diffusent dans l'environnement et constituent une empreinte biochimique dont la détection signe une activité fongique.

Ainsi, afin de détecter l'ensemble des cas de contaminations, une technique basée sur l'identification des traceurs chimiques composant cette empreinte et permettant le calcul d'un indice de contamination a été développée et brevetée par le CSTB en 2007.

Cette technique a été éprouvée lors de différentes campagnes de mesures à visée épidémiologique. Des études menées en collaboration avec des organismes en charge de la sauvegarde du patrimoine tels que le Laboratoire de Recherche des Monuments Historiques, les Archives Nationales ou encore la Bibliothèque Nationale de France, montrent également l'intérêt des empreintes chimiques comme moyen de détection dans des environnements aussi spécifiques que des châteaux, des musées ou encore grottes ornées. Cet outil a également été mis en œuvre dans une étude préliminaire portant sur la contamination fongique des établissements scolaires et son application à plus grande échelle est en cours de discussion auprès des pouvoirs publics.

Le présent travail de thèse poursuit ces travaux en développant un système autonome de microcapteurs chimiques adapté à la mesure *in situ*. Outre le gain de temps engendré par l'absence de la phase d'analyse en laboratoire, intégrée dans le système à développer, ce dispositif doit assurer une surveillance continue d'environnements fréquentés par le public, tels que les musées, les écoles, les centres hospitaliers....

Les progrès dans le domaine de l'électronique, et plus particulièrement de la micro-électronique, permettent d'envisager le développement d'un système d'analyse de taille réduite dédié à la détection des développements fongiques.

Dans ce contexte, l'objectif de cette recherche vise l'élaboration d'un microsystème d'analyse de l'air destiné à la détection rapide d'un développement fongique dans les espaces clos. Ce microsystème d'analyse devra effectuer un certain nombre d'opérations dont le prélèvement, le transfert, la séparation ou encore l'analyse d'un échantillon. La miniaturisation de systèmes tels que la chromatographie montre un intérêt particulier pour des applications portables, fiables et de faibles coûts.

Ainsi, le système proposé repose d'une part sur l'épuration et la concentration de l'échantillon et d'autre part sur le développement d'une matrice de différents capteurs permettant l'obtention d'une empreinte globale spécifique.

Cette recherche s'est appuyée à la fois sur la méthode de détection fongique développée au CSTB et sur l'expertise scientifique et technique de l'ESIEE concernant les techniques de conception et de microfabrication en vue de la miniaturisation des éléments du système chromatographique.

Le présent manuscrit comporte deux parties. La **première** concerne les COV du métabolisme fongique et comporte :

- Un état de l'art des micromycètes isolés des environnements intérieurs et des méthodes de surveillance et de diagnostic des espaces clos vis-à-vis de ces biocontaminants (Chapitre 1).

- La détermination expérimentale des empreintes chimiques spécifiques d'une croissance fongique pour des couples moisissures / matériaux fréquemment rencontrés dans le cadre de la biodétérioration du patrimoine culturel (Chapitre 2).
- La validation *in situ* des empreintes chimiques dans différents sites patrimoniaux, et définition de la stratégie d'échantillonnage optimale (Chapitre 3).

La **seconde partie** de cette étude est consacrée à la conception du microsystème pour la détection et l'analyse des composés cibles.

Elle comporte :

- Une synthèse bibliographique présentant les solutions technologiques consacrées à l'analyse des gaz et plus particulièrement l'intérêt de l'utilisation des capteurs chimiques pour la surveillance de composés gazeux dans l'air, ou encore les microstructures dédiées à l'analyse des gaz par chromatographie en phase gazeuse (Chapitre 1).
- La recherche des couches sensibles aux COV cibles à partir d'un système multi-capteurs composé de polymères conducteurs (Chapitre 2).
- L'élaboration des microstructures composant le système d'analyse (Chapitre 3).
- L'intégration et caractérisation du microsystème d'analyse (Chapitre 4).



**PREMIERE PARTIE :**  
**DETECTION DE CONTAMINATIONS FONGIQUES DANS**  
**LES ENVIRONNEMENTS INTERIEURS**



## CHAPITRE I : ETAT DE L'ART

Cette synthèse bibliographique présente brièvement les micromycètes, biocontaminants susceptibles de croître dans les environnements intérieurs, et les conséquences sanitaires associées. Les techniques de surveillance et de diagnostic de ces biocontaminants seront également abordées dans ce premier chapitre.

### I LES MOISSURES DES ENVIRONNEMENTS INTERIEURS

#### I.1 ELEMENTS DE DEFINITION

Les champignons microscopiques, ou micromycètes, appartiennent au règne *Fungi* habituellement divisé en trois groupes au sein desquels les champignons « primitifs » (*Myxomycètes*, *Oomycètes*) se distinguent des « vrais » champignons (*Eumycètes*).

Une classification simplifiée est présentée dans la Figure I-1. L'identification et la classification des champignons sont à ce jour essentiellement basées sur des caractères morphologiques et biochimiques, les Eumycètes ou encore champignons « vrais » étant subdivisés selon leur mode de reproduction, sexuée ou asexuée.

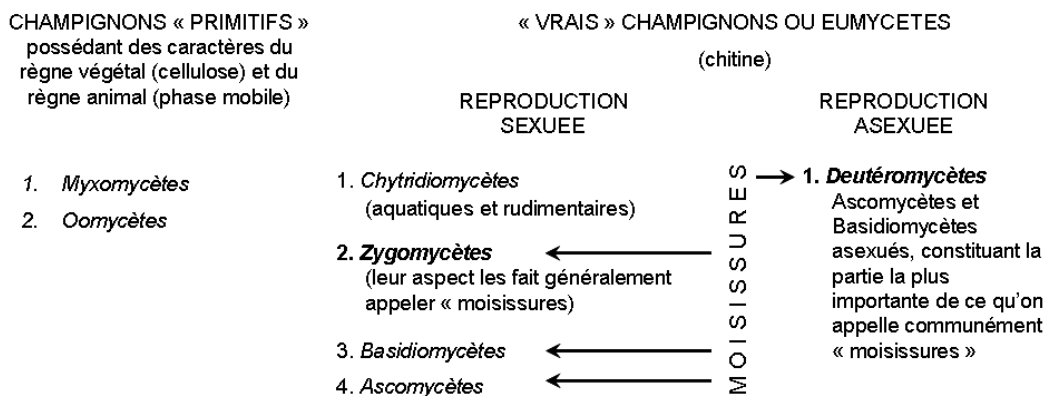


Figure I-1 : Classification simplifiée du règne *Fungi* (Chasseur et Nolard, 2003)

Notre intérêt se portera principalement sur les Deutéromycètes ou *fungi imperfecti* qui constituent la majeure partie de la flore fongique des environnements intérieurs (Prescott *et al.*, 1995; Cahagnier, 1998; Chasseur et Nolard, 2003) et les Basidiomycètes pour leur rôle dans la détérioration du bois (Bousta, 1998).

Les moisissures sont des organismes filamenteux eucaryotes porteurs de spores et dépourvus de chlorophylle. Contrairement aux végétaux, ces microorganismes sont incapables de synthétiser la matière organique à partir du gaz carbonique atmosphérique et utilisent celle puisée dans le substrat comme source d'énergie, de carbone et d'électrons : ces microorganismes sont dits chimiohétérotrophes.

Ces microorganismes sont constitués de filaments longs, fins et ramifiés, à structure cellulaire, dénommés hyphes (Figure I-2). Ceux-ci forment une masse emmêlée appelée mycélium ou thalle. Leur multiplication est assurée par des particules microscopiques appelées conidies dont le diamètre est compris entre 3 et 30 µm (Gravesen *et al.*, 1994; Madelin, 1994).



Figure I-2 : Observation microscopique d'une moisissure (*Penicillium spinulosum*)  
photographie LMEI CSTB

## I.2 COLONISATION DES ENVIRONNEMENTS INTERIEURS

### I.2.A Les étapes et facteurs influençant la croissance

Trois phases interviennent lors du développement des moisissures : la germination, la croissance et la sporulation. En 2001, Osharov et May étudient et décrivent les différentes phases du cycle de vie asexuel d'*Aspergillus nidulans* (Figure I-3). Les conidies sont produites par une structure spécialisée, le conidiophore. Après dispersion et contact avec un milieu adéquat, les conidies germent et donnent naissance à un hyphe. Le développement de cette structure forme un mycélium ramifié dont émerge un hyphe aérien porteur de conidiophores (Boissier, 2003).

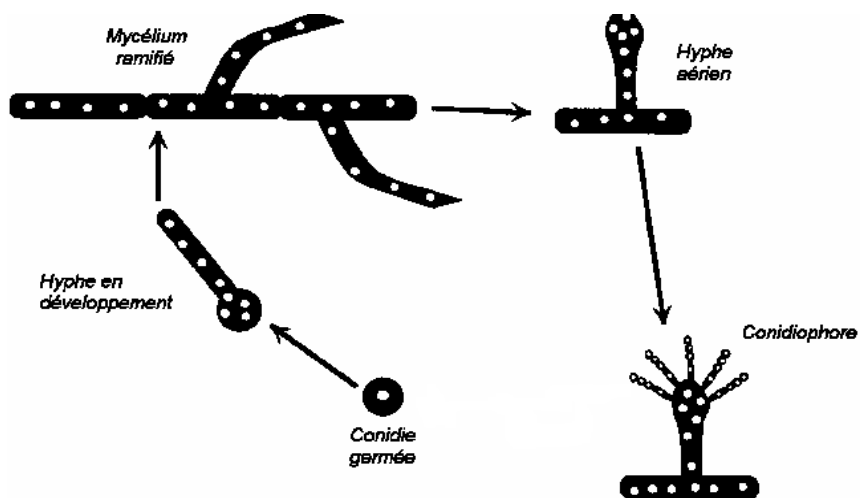


Figure I-3 : Cycle de vie asexuel d'*Aspergillus nidulans* (d'après Osharov et May, 2001;  
Moullarat, 2005)

- La germination :

Cette étape comporte deux phases. Dans un premier temps, la spore enfle (elle s'hydrate), son diamètre et sa biomasse augmentent. Lors de cette croissance sphérique, de nouvelles couches sont formées et recouvrent uniformément la surface intérieure de la spore. Les propriétés de surfaces sont modifiées, l'adhérence spore-spore et spore-substrat augmente. L'apparition d'un hyphe à partir de la spore hydratée correspond à la seconde phase de la germination.

- La croissance :

En 1994, Carlile et Watkinson décrivent précisément cette étape (Carlile et Watkinson, 1994). L'hyphe ayant émergé de la spore, après quelques heures, croît de manière exponentielle jusqu'à atteindre une vitesse d'élongation maximum de l'ordre du mm/h pour ensuite s'allonger à vitesse linéaire.

Quatre zones, bien qu'elles ne soient pas clairement délimitées, peuvent être distinguées sur une culture fongique en phase de croissance :

- ✓ la zone «âgée» de la colonie, au centre, où les hyphes sont souvent creux, du fait de la migration de leur contenu protoplasmique dans les spores ou dans des parties plus jeunes de la colonie. Dans cette région, des autolyses entraînent la disparition des parois cellulaires.
- ✓ la zone de fructification, la biomasse y est stationnaire et les spores en formation sur les hyphes émergent de la surface du milieu,
- ✓ la zone productive, où se produit l'augmentation de biomasse la plus importante,
- ✓ la zone extérieure de la colonie, dite extensive, correspond à la région dans laquelle les hyphes progressent dans un milieu inexploité.

- La sporulation et la dissémination :

Ultime phase du développement fongique, la sporulation consiste en la formation de particules de taille comprise essentiellement entre 3 et 30  $\mu\text{m}$ , enveloppées d'une paroi épaisse avant séparation (chlamydo-spores), enfermées dans des "sacs" à l'extrémité de l'hyphe (sporangio-spores), produites sur les extrémités ou les côtés de l'hyphe (conidio-spores), ou générées par bourgeonnement d'une cellule mère végétative (blastospores). Les conidies sont disséminées par des mécanismes actifs ou passifs. Dans des conditions optimales de croissance, une spore unique de moisissures peut germer et produire une colonie fongique avec des centaines de milliers de spores en quelques jours. L'émission des spores n'est pas un phénomène continu mais dépend des conditions environnementales et du stade de croissance du microorganisme.

Durant ces étapes le microorganisme va dégrader les constituants du substrat nécessaires à son développement par l'émission d'enzymes et d'acides, pouvant induire la détérioration des supports.

En 2001, Osharov et May décrivent les différentes phases du cycle de vie asexuel d'*Aspergillus nidulans* (Osharov et May, 2001). Les conidies sont produites par une structure spécialisée, le conidiophore. Après dispersion et contact avec un milieu adéquat, les conidies germent et donnent naissance à un hyphe. Le développement de cette structure forme un mycélium ramifié dont émerge un hyphe aérien porteur de conidiophores. La colonisation du substrat est réalisée par extension et ramification des hyphes.



Durant ses phases de croissances, le microorganisme dégrade les constituants du substrat nécessaires à son développement induisant la détérioration des supports. La colonisation des matériaux par les moisissures résulte de deux types d'action. La première, physique, liée au développement des hyphes dans le matériau, conduisant à la rupture de la structure du support. La seconde, chimique, imputable à la production de divers métabolites agissant par assimilation ou dissimilation.

Concernant le processus physique ou mécanique, ses effets étudiés sur la pierre se traduisent par un arrachement des particules de matériaux qui sont entraînées par le mycélium au travers de la surface, les structures fongiques envahissent alors les pores ainsi créées et déstabilisent la structure minérale du matériau (Gomez-Alarcon et Angeles de la Torre, 1994).

Concernant l'action chimique, lors des processus d'assimilation, les constituants du matériau sont utilisés comme nutriments après avoir été réduits par diverses enzymes extracellulaires qui facilitent la pénétration des hyphes dans le matériau. Les processus de dissimilation sont liés à la production d'acides organiques et de pigments. Les acides organiques, tels que les acides gluconique, citrique, oxalique, malique, succinique, itaconique..., produits en quantités variables durant l'activité métabolique sont capables de réagir avec le substrat par dissolution des cations ou par chélation des ions métalliques présents dans les peintures, par exemple. Cette dernière réaction peut conduire à la formation de sels. Ainsi, l'acide oxalique réagissant avec le calcium donne naissance à des oxalates de calcium.

Le dioxyde de carbone, produit par tous les organismes aérobies et notamment les moisissures lors de la respiration, joue également un rôle dans la dégradation des supports. En effet, à partir d'un certain taux d'humidité, ce gaz peut se transformer en acide carbonique, capable de dissoudre le calcium et le magnésium pour former des bicarbonates de calcium et de magnésium hydrosolubles.

Outre l'action directe de ces acides, leur production favorise la croissance d'espèces fongiques acidophiles qui pourront poursuivre la dégradation du support (Singh, 1994; Garg *et al.*, 1995; Sand, 1997). Les moisissures produisent également des pigments organiques, résultant de l'activité métabolique, à l'origine de l'apparition de taches sur les matériaux colonisés tels que les papiers peints (Gargani, 1968; Ionita, 1973; Agrawal *et al.*, 1988; Bassi et Giacobini, 2001), quasiment impossibles à éliminer sur des surfaces peintes, par exemple.

Les champignons sont des organismes généralement aérobies, la quantité d'oxygène disponible est donc un facteur influent de la croissance.

Ainsi, les moisissures sont susceptibles de se développer partout où de la matière organique est disponible. Les besoins nutritionnels requis sont divisés en deux catégories : les nutriments constitutifs (le carbone, l'hydrogène, l'oxygène, le phosphore, le potassium, l'azote, le soufre et le magnésium) et les oligonutriments (le fer, le cuivre, le manganèse, le zinc et le molybdène) (Boissier, 2003).

Les moisissures, comme tous les organismes ont également besoin d'eau comme solvant (activité de l'eau  $a_w$  de croissance comprise entre 0,70 et 0,97 pour les principales espèces isolées dans les environnements intérieurs) (Singh, 1994; Yang et Johanning, 1997; Clarke *et al.*, 1999). Dans les logements, une corrélation entre la présence d'eau liquide sur les surfaces et des contaminations fongiques a été constatée. En revanche, aucune corrélation n'a été démontrée dans cette étude avec l'humidité relative mesurée dans l'air (Moularat *et al.*, 2008a). Le développement fongique semble donc dépendre de l'eau disponible (principalement à l'état liquide) et cette notion peut être très différente de l'humidité relative. Concernant la température, l'optimale de croissance s'observe généralement à 25°C. Cependant, une croissance est possible sur une large gamme de températures (de 0 à 10°C pour les minimales et de 35 à 52°C pour les maximales), ce paramètre affectant

essentiellement leur cinétique de croissance (Ayerst, 1966; Panasenko, 1967; Yang et Johanning, 1997; Clarke *et al.*, 1999).

Cette cinétique est généralement maximale pour des substrats de pH acides à neutres (entre 4 et 7). La gamme de pH permettant la croissance est toutefois bien plus étendue avec des valeurs limites comprises entre 2,2 et 9,6 pour les espèces les plus communes (Adan *et al.*, 1994).

Le rayonnement lumineux est également un critère intervenant dans la croissance de ces entités biologiques. En effet, ces rayonnements peuvent avoir un effet stimulant ou inhibiteur sur la germination et la croissance fongique selon la longueur d'onde et l'espèce considérées. Cette propriété est d'ailleurs utilisée comme technique potentielle de stérilisation. Ainsi, Nakamura a démontré par culture que 79 % des spores d'*Aspergillus niger* soumises, durant 1 seconde à une irradiation de longueur d'onde égale à 254 nm, sont inactivées (Nakamura, 1987). Un effet fongicide est constaté pour des longueurs d'onde de 225–302 nm (UVC) (Kowalski *et al.*, 2000).

### I.2.B Principales espèces fongiques isolées

Selon différentes études menées en Europe, 70 à 90 % de la flore fongique des environnements intérieurs appartient aux genres *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium* et *Alternaria* (Nolard, 1997; Janinska, 2000; WHO Regional Office for Europe, 2004).

Une étude menée sur l'identification des moisissures dans 130 habitations belges sur des murs et surfaces horizontales, a montré que les espèces fongiques les plus couramment rencontrées sont *Aspergillus versicolor*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Penicillium chrysogenum* et *Stachybotrys chartarum* (Beguin et Nolard, 1994).

En 2002, Hyvärinen *et al.* ont identifié les micromycètes présents sur 1140 échantillons de matériaux de construction récupérés *in situ*. Sur l'ensemble de ces produits, *Penicillium* était le plus fréquemment isolé. Selon les types de matériaux, les genres les plus souvent identifiés sont *Cladosporium*, *Stachybotrys*, *Aspergillus* ou *Acremonium* (Hyvärinen *et al.*, 2002). Une disparité entre les genres ou les espèces est donc constatée selon les études notamment en raison des différences de climats et des matériaux.

## I.3 CONSEQUENCES SANITAIRES

Outre la dégradation des matériaux colonisés, la présence d'une contamination fongique dans les environnements intérieurs n'est pas sans conséquences sanitaires. Les effets sanitaires induits par la présence de moisissures dans l'habitat sont généralement répartis en quatre catégories : les infections, les maladies immuno-allergiques, les toxi-infections, et les effets irritatifs.

### I.3.A L'aspergillose invasive nosocomiale.

Comme toute infection, elle résulte de l'entrée et de la multiplication d'agents biologiques chez un hôte. Cette maladie est généralement provoquée par l'inhalation de conidies d'*Aspergillus*. Elle constitue une préoccupation majeure dans les services hébergeant des patients immunodéprimés. Son pronostic est très sévère avec 50 à 100 % de décès, au sein d'établissements hospitaliers. Cette infection est souvent associée à des travaux de rénovation durant lesquels la concentration d'*Aspergillus* dans l'air et sur les surfaces augmente de façon considérable (Aisner *et al.*, 1976; Arnou *et al.*, 1978).

Lors d'une enquête épidémiologique réalisée entre 1994 à 1999 sur les hôpitaux parisiens, le Réseau Aspergillose de l'AP-HP a recensé 621 cas d'aspergillose invasive nosocomiale (AIN) dont 115 certaines et 506 probables (Cornet *et al.*, 2002).

### I.3.B Les maladies immuno-allergiques.

Les réactions allergiques rencontrées sont provoquées par des conidies isolées, en amas ou encore par des hyphes, qui peuvent entraîner certaines maladies telles que rhinites, asthme, alvéolite allergique extrinsèque. Ces réactions allergiques immédiates se développent dans les minutes qui suivent l'exposition (hypersensibilité de type I). Seule l'alvéolite allergique extrinsèque (affection moins fréquente) se développe après une forte exposition aux allergènes spécifiques (pendant 4-8 heures, hypersensibilité de type III). Une hypersensibilité peut également se manifester lors d'un second contact avec l'allergène (hypersensibilité de type IV) (Roitt *et al.*, 1985; Gravesen *et al.*, 1994; Yang et Johanning, 1997). Parmi les patients atteints d'allergie respiratoire, jusqu'à 30 % d'entre eux sont allergiques aux champignons. Une étude réalisée dans des habitations au Danemark révèle le rôle allergique de ces organismes parmi une population atopique, où 8 % des adultes et 23 % des enfants sont touchés. Pour ces derniers, on note 44 % de cas d'asthme et 23 % de rhinites. Halewyn *et al.*, indiquent que 5 % des enfants d'âge scolaire réagissaient positivement aux tests d'extraits de moisissures, ce taux pouvant atteindre 10 % de la population voire 21 à 27 % chez les personnes souffrant d'asthme (Halewyn *et al.*, 2003).

### I.3.C Les toxi-infections.

La toxicité d'une moisissure est essentiellement due à la production de métabolites secondaires appelés mycotoxines. C'est seulement depuis les années 60, quand le caractère cancérigène des aflatoxines a été démontré, que le caractère pathologique des mycotoxines a été posé, notamment par la présence de mycotoxines dans les aliments (Frayssinet, 1998; Bertichamps *et al.*, 2000; Bertinchamps *et al.*, 2000). Plusieurs de ces toxines sont stables et leur toxicité peut persister longtemps et ce même lorsque les éléments fongiques ne sont plus viables. Il faut toutefois préciser qu'il n'existe actuellement pas de données sur la persistance de cette toxicité (Halewyn *et al.*, 2003). Les voies de contamination sont l'ingestion d'aliments contaminés par des champignons (Cahagnier, 1998; Weidenbörner, 2001), le contact cutané, et l'inhalation de particules aérosolisées, ces métabolites étant suspectés de s'adsorber sur les poussières ou d'être contenus dans la paroi des spores et des fragments mycéliens (Weidenbörner, 2001; Fung et Hughson, 2002). Le transfert de ces métabolites d'un matériau de construction contaminé vers l'air a été mis en évidence, en laboratoire, en 2008 (Moularat et Robine, 2008).

Les effets nocifs induits par les mycotoxines les plus fréquemment isolées dans l'habitat sont multiples selon les métabolites incriminés. Ces métabolites sont susceptibles d'être neurotoxiques, cancérigènes, cytotoxiques, hémorragiques... (Krishnamachari *et al.*, 1975; Yang et Johanning, 1997; Hurst et Martin, 1998; Alvarez *et al.*, 2004; Blumenthal, 2004).

Des études récentes ont ainsi montré que des doses identiques de ces mycotoxines peuvent être plus toxiques inhalées qu'ingérées et que l'introduction de ces toxines dans l'appareil respiratoire peut entraîner des allergies graves ou des symptômes non spécifiques tels que maux de tête, de gorge, alopecie, grippe, diarrhée, fièvre... (Miller, 1990; Davies *et al.*, 1995; Yang et Johanning, 1997; Trucksess et Polhand, 2001).

Les conséquences de l'inhalation de mycotoxines sont soupçonnées d'être particulièrement graves chez certaines populations dites sensibles telles que les nourrissons. Ainsi *Stachybotrys chartarum*, reconnu pour causer diverses mycotoxicoses, a été associé à des cas d'hémorragie pulmonaire chez les jeunes enfants lors d'une éclosion survenue à Cleveland (Ohio) en 1993-1994 causant la mort de plusieurs nouveaux nés (Montana *et al.*, 1997).

La révision des études sur cette éclosion a fait ressortir que le lien étiologique n'était pas clairement établi. Toutefois, des signalements de cas similaires continuent d'être publiés et les lignes directrices sur l'évaluation et l'élimination de la contamination fongique en milieu

intérieur publiées par la ville de New York (Service d'hygiène de la ville de New York, 2000) recommandent que les nourrissons souffrant d'hémorragie pulmonaire venant d'un domicile contaminé n'y retournent qu'une fois les mesures correctives apportées.

Outre les mycotoxines, les conidies contiennent une substance biologiquement active : le  $\beta(1-3)$  glucane. Tout comme les mycotoxines, cette molécule serait impliquée dans l'apparition du syndrome toxique ODTS (Syndrome Toxique des Poussières Organiques - Organic Dust Toxicity Syndrome) (Wan et Li, 1998; ACGIH, 1999; Thorne et Heederik, 1999). Le  $\beta(1-3)$  glucane entraîne une réduction du nombre de macrophages et inhibe la phagocytose pulmonaire.

#### I.3.D Effets irritatifs.

Plusieurs études imputent au COV (potentiellement issus du métabolisme fongique) un rôle important dans l'apparition du Syndrome des Bâtiments Malsains ou SBS (Sick Building Syndrome) bien qu'une multitude de facteurs puissent en être la cause (Wessen *et al.*, 1995; Wilkins et Larsen, 1995; Bjurman, 1999). Le SBS se définit par l'association de symptômes non spécifiques ressentis par les occupants d'habitations dites « malsaines » tels que fatigue, irritation des muqueuses oculaires et buccales, céphalées, gêne respiratoire... (Lyles *et al.*, 1991; Davies *et al.*, 1995; Godish, 1995; Vincent et Pradalier, 1997).

Les COV, typiquement des alcools et des aldéhydes à chaîne courte, sont aussi responsables « d'odeurs désagréables » et donc d'inconfort olfactif (Schleibinger *et al.*, 2002). L'odeur de moisi ou l'odeur terreuse est caractéristique (Gravesen *et al.*, 1994).

Cependant l'impact sanitaire des COV reste relatif. Lors d'une étude sur la cytotoxicité de certains COV, il a été établi que le COV le plus toxique de cette étude a une toxicité 1000 fois moins élevée que celle de la gliotoxine sur des cellules de poumon humain (Kreja et Seidel, 2002).

Toutefois, il n'existe pas actuellement d'informations validées en matière d'effets à court ou à long terme de ces composés, même en faible quantités. De plus, la présence de certains COV comme l'éthanol possèdent un fort pouvoir synergique vis-à-vis d'autres substances irritantes voire toxiques (Schmidt et Etkin, 1994).

## II SURVEILLANCE ET DIAGNOSTIC DES CONTAMINATIONS FONGIQUES DANS LES ENVIRONNEMENTS INTERIEURS : APPROCHES ANALYTIQUES

### II.1 INSPECTION DES LOCAUX

L'examen visuel est la première étape dans la détermination de la présence de moisissure au sein d'un local. Il consiste à rechercher toutes traces d'une contamination fongique : taches d'humidité, signes de dégâts des eaux (papier décollé, peinture cloquée), odeur suspecte, développement fongique visible...

La détermination de la superficie des surfaces visiblement contaminées conditionne le type de travaux d'élimination de ces microorganismes et les personnes habilitées à réaliser les opérations de nettoyage et de réfection des locaux contaminés. Ainsi, concernant cet aspect, le service d'hygiène de la ville de New York, au travers de son document présentant les lignes directrices applicables à l'évaluation et l'élimination de la contamination fongique en milieu intérieur, distingue 5 niveaux de travaux et de confinement selon la superficie mais également la localisation de la prolifération fongique, le dernier niveau concernant ainsi la colonisation des systèmes de chauffage, ventilation et conditionnement d'air (Service d'Hygiène de la ville de New-York, 2000).

Une étude réalisée en France métropolitaine dans 496 logements évalue à 37 % les cas de contaminations fongiques, en estimant à 70 % les cas de contaminations cachées (derrière une cloison, dans les systèmes de ventilation, sous un revêtement de sol...) (Kirchner *et al.*, 2007; Moularat *et al.*, 2008a).

### II.2 MESURE DES CHAMPIGNONS MICROSCOPIQUES

#### II.2.A Echantillonnage

Le terme d'aérosols définit des particules solides, liquides ou les deux, en suspension dans un milieu gazeux, dont la vitesse limite de chute est négligeable ( $\leq 25$  cm/s) (Renoux et Boulaud, 1998). Les microorganismes viables sont métaboliquement actifs et susceptibles de se multiplier, ils produiraient, selon certains auteurs, plus d'allergènes et de toxines, et induiraient des réactions sur la santé plus importantes que les non viables (Eduard et Heederik, 1998). Au sein du groupe des viables, deux sous-groupes sont distingués : les cultivables ou revivifiables et les non cultivables. Les « cultivables » peuvent se développer en conditions contrôlées en laboratoire, sur milieux de culture appropriés à température appropriée. Les résultats sont exprimés en nombre d'unités formant colonie (UFC) ou en CFU (colony-forming units). Les « non cultivables » ne se développent pas en laboratoire, soit à cause de stress (température, dessiccation) (Wessen *et al.*, 1999), soit à cause des conditions de cultures non appropriées. La proportion de microorganismes viables non cultivables par rapport aux cultivables est difficile à évaluer et varie selon les espèces mais pourrait atteindre 90 % (Alvarez *et al.*, 1995). Néanmoins, les méthodes basées sur la culture sont à l'heure actuelle les seules à permettre une identification, elles restent donc incontournables.

Le comportement des aérosols est plurifactoriel : taille, masse volumique, absorbance.... Par ailleurs, l'aérosolisation des spores fongiques à partir du support de croissance va être étroitement liée aux conditions environnementales (humidité, vitesse des flux aérauliques environnants,...) ainsi qu'à la nature de l'espèce considérée (Pasanen *et al.*, 1993; Boissier, 2003).

Les micromycètes sont usuellement prélevés des surfaces et de l'air. Sur les supports, trois techniques d'échantillonnage sont employées :

- Sur les surfaces planes suspectes et non humides, un ruban adhésif est appliqué. Les conidies et structures mycéliennes fixées sont transférées sur un milieu de culture ou identifiées directement au microscope (Chasseur et Nolard, 2003),
- L'usage des boîtes et lames « contact ». Le milieu de culture est déposé en excès sur une lame ou dans une boîte de Pétri (boîte «contact») permettant d'obtenir une surface gélosée bombée applicable sur les supports à tester. Le prélèvement standard nécessite une pression de 25 g par  $\text{cm}^2$  pendant 10 secondes. Des « Pétri-films », petites plaques de papier recouvertes d'un milieu nutritif déshydraté, peuvent également être utilisées. (Chasseur et Nolard, 2003).
- L'écouvillonnage, avec un écouvillon stérile humidifié ou non, d'une surface de  $25 \text{ cm}^2$  est considéré comme équivalent au prélèvement par boîte contact à condition de décharger l'écouvillon en étoile sur une boîte de Pétri de diamètre 9 cm. La standardisation est cependant difficile à obtenir et dépend du manipulateur. Peu onéreuse, cette dernière technique permet de réaliser des échantillonnages dans des conditions d'accès difficiles et aboutit après culture, à un résultat qualitatif.

Les techniques d'échantillonnage dans l'air ont pour objet de séparer les particules du flux d'air pour les recueillir sur un ou plusieurs milieux sélectionnés. Les trois principes de collecte les plus courants sont basés sur l'inertie des particules (impaction sur milieu solide ou support adhésif ; impaction en milieu liquide) et la filtration.

Dans le cas d'un écoulement curvilinéaire, l'inertie provoque la déviation des particules des lignes de courant du fluide. Ce mécanisme est mis en œuvre, notamment dans les impacteurs au sein desquels l'air est brusquement accéléré par passage au travers d'une section réduite et brutalement dévié par une surface de collection solide (gélose ou surface adhésive) ou liquide. Les particules selon leur inertie vont, soit suivre les lignes de courant, soit s'impacter sur la surface de collection pour celles possédant l'inertie la plus importante.

- L'impaction en milieu solide permet de séparer la particule du flux du gaz porteur, suivant les propriétés d'inertie de celle-ci. L'air est aspiré à travers une série d'orifices (grille) et les particules ayant une inertie suffisante viennent s'impacter sur une surface cible (support de collecte) placée sur le trajet du flux d'air. Les particules de plus faible inertie sont réentraînées dans le flux d'air sortant (Figure I-4).

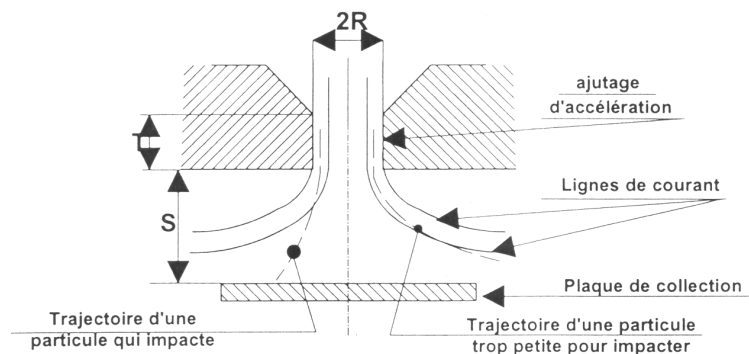


Figure I-4 : Schéma du principe de l'impaction en milieu solide. D'après Renoux et Boulaud, 1998.

L'impaction dépend des propriétés d'inertie de la particule (taille, densité, vitesse) et des caractéristiques physiques de l'impacteur (géométrie, nombre et dimensions des orifices, débit d'échantillonnage, trajectoire et vitesse du flux d'air) (Nevalainen *et al.*, 1993).

Le support de collecte consiste généralement en un milieu nutritif gélosé adapté pour l'isolement du microorganisme visé. Un matériau (lame, surface adhésive, filtre) peut lui être substitué permettant une analyse microscopique ultérieure.

L'impaction dépend de plusieurs facteurs tels que la taille, la densité et la vitesse initiale des particules ainsi que des paramètres physiques du dispositif de collecte (dimension de la buse, débit du gaz porteur, distance entre la buse et la surface de collection).

Les impacteurs sur support adhésif permettent la capture des spores en continu sur plusieurs jours, voire une semaine. L'air est aspiré à travers une fente, les particules étant projetées sur une surface adhésive. La vitesse du tambour qui présente l'adhésif face à la fente conditionne la durée du prélèvement ainsi que le nombre de particules capturées. L'identification des champignons se fait au moyen d'une lecture microscopique directe des bandes adhésives. Elle se limite, même avec un personnel entraîné et formé, à quelques genres de champignons dont les spores sont morphologiquement reconnaissables (*Alternaria*, *Dreschlera*, *Cladosporium*, *Ustilago*, *Epicoccum*...). Les genres comme *Penicillium* et *Aspergillus*, aux spores de morphologies et de tailles similaires sont confondus. Ces appareils sont de surcroît volumineux et électriquement non autonomes.

- Lors de l'impaction en milieu liquide, l'air est aspiré au travers d'un tube capillaire, puis propulsé dans ou à la surface d'une suspension liquide.

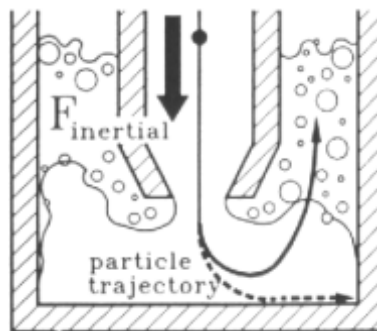


Figure I-5 : Schéma du principe de l'impaction en milieu liquide. D'après Buttner *et al.*, 1997.

L'efficacité de collecte est fonction de la vitesse d'aspiration et du diamètre de l'orifice d'aspiration.

Le liquide de prélèvement est généralement de l'eau ou une solution physiologique à laquelle peuvent être ajoutés des agents de protection contre les chocs osmotiques ou la dessiccation, des tensioactifs... Après l'échantillonnage, le liquide peut être dilué ou concentré. La collecte en milieu liquide est compatible avec un grand nombre de méthodes d'analyses (culture, tests biochimiques, analyse moléculaire).

Cette méthode permet des prélèvements de longue durée grâce à la possibilité de dilution des échantillons (pas de problème de saturation contrairement aux impacteurs en milieu solide).

- La méthode par filtration consiste à séparer les aérosols du fluide vecteur en les faisant passer au travers d'un média filtrant. La collecte des particules repose sur l'action simultanée de différents mécanismes (impaction inertielle, interception, diffusion) dont l'importance relative dépend de la dimension des particules et de la vitesse de l'écoulement (Figure I-6).

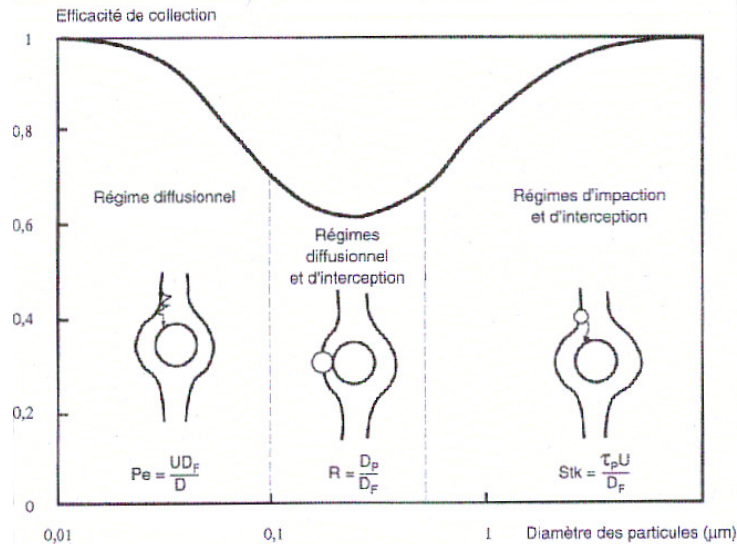


Figure I-6 : Représentation schématique de l'efficacité d'un filtre en fonction de la dimension des particules et des différents régimes de diffusion. D'après Renoux et Boulaud, 1998.

La collecte des particules peut se faire soit à la surface du média filtrant, soit à l'intérieur du réseau poreux. L'efficacité de collecte est fonction de la porosité et de l'épaisseur du filtre, du diamètre des particules et de la vitesse du flux d'air (Lee et Ramamurthi, 1993). Les filtres peuvent être fibreux (fibres de verre) ou membraneux (ester de cellulose, chlorure de polyvinyle, polycarbonate, téflon). Ils peuvent être enduits d'une substance collante (PVC + vaselinetoluène) pour piéger les spores.

Des filtres en gélatine existent également et ont une texture fibreuse.

Après recueil, les filtres peuvent être, soit examinés directement au microscope ; soit disposés sur un milieu de culture gélosé (les colonies se développent sur le filtre) ; soit rincés dans un liquide stérile, lequel est ensuite dilué en série et chaque dilutionensemencée sur milieu de culture. Après incubation, les colonies sont dénombrées et identifiées. Les concentrations par mètre cube sont calculées à partir du facteur de dilution et du volume d'air prélevé.

D'autres méthodologies sont appliquées au prélèvement des particules biologiques :

- La sédimentation est l'une d'entre elles. Il s'agit d'une technique passive, fondée sur le dépôt des particules aéroportées sous l'action de la gravité. Pratiquement, elle consiste à exposer un milieu nutritif contenu dans une boîte de Pétri à l'air ambiant, pendant une durée déterminée arbitrairement. Seules les particules sédimentables, ayant une vitesse de chute suffisante, sont recueillies. La méthode est dite non volumétrique, car elle ne permet pas de rapporter le nombre de particules collectées à un volume d'air échantillonné. Par ailleurs, elle est tributaire des caractéristiques de l'écoulement et des perturbations aérauliques (Griffiths et Decosemo, 1994).



- La précipitation électrostatique consiste à ioniser les aérosols échantillonnés avant de les collecter sur des surfaces métalliques de charges opposées. Des applications récentes à la mesure des aérosols biologiques sont décrites entre autres par Mainelis *et al.* (2002).

## II.2.B Analyses

Le mode de collecte va conditionner les techniques d'analyse mises en œuvre *a posteriori*. L'analyse des micromycètes peut être effectuée selon deux approches, soit par une mesure des microorganismes cultivées, soit par le dosage d'éléments constitutifs (l'ergostérol, les  $\beta$ -glucanes, la chitine, les EPS ou encore des gènes spécifiques).

Dans le cas de l'approche culturale, le dénombrement et l'identification des champignons reposent alors sur un examen macroscopique et microscopique des colonies par des mycologues entraînés. En ce qui concerne la seconde approche, la plus grande stabilité dans le temps des composants provenant des cellules fongiques et leur indépendance vis-à-vis de la viabilité des moisissures sont les principaux avantages de cette approche.

**La méthode culturale** permet de quantifier la fraction cultivable des microorganismes collectés. Il existe plusieurs milieux de culture pour une même famille de champignons. Certains genres ont des besoins nutritifs spécifiques (cellulotiques, osmophiles) ou des conditions d'incubations spécifiques (thermophiles, psychrophiles). Le dénombrement et l'identification des champignons reposent sur un examen macroscopique et microscopique des colonies par des mycologues entraînés. L'examen macroscopique des colonies et l'observation microscopique des conidies et des structures mycéliennes permettent d'identifier les moisissures collectées.

**L'analyse de la biomasse** par mesure d'éléments constitutifs est réalisée par dosage de l'ergostérol, des  $\beta$ -glucanes, de la chitine ou encore des Polysaccharides extracellulaires (EPS) :

- Les moisissures contiennent dans leur membrane cellulaire un ester d'ergostérol dont l'alcool associé est commun à la majorité des champignons microscopiques. Le dosage de l'ergostérol est couramment utilisé pour déterminer la contamination de substrats solides tels que les matériaux de construction (Pasanen *et al.*, 1999) ou les poussières de maisons (Axelson *et al.*, 1995). Ce dosage est également utilisé pour estimer la concentration fongique aéroportée des environnements intérieurs (Miller et Young, 1997; Robine *et al.*, 2005).
- Les  $\beta$ -glucanes sont des constituants spécifiques de spores fongiques, présents dans la plupart des espèces de moisissures. Leur dosage est réalisé par test LAL (Limulus Amebocyte Lysate) modifié ou tests immunochimiques (Enzyme Immuno Assay : EIA) (Pasanen, 2001). Leur dosage est d'autant plus informatif que ces constituants ont probablement un rôle direct dans la réponse inflammatoire des personnes exposées, indépendamment d'une réaction immunologique (Rylander, 1997; Dillon *et al.*, 1999; Douwes *et al.*, 2000; Wouters *et al.*, 2000; Walinder *et al.*, 2001; Bex et Squinazi, 2006). D'autre part, tout comme l'ergostérol, la méthode indépendante de la viabilité des cellules. La méthode par LAL est assez simple (commercialisée) et sensible, mais peu spécifique. La méthode par EIA est plus reproductible et plus spécifique mais n'est pas assez sensible pour les recherches dans l'air (Douwes *et al.*, 1996). Ce dosage présente deux principaux inconvénients : il ne donne pas d'information sur les espèces présentes et il n'y a pas de données de référence permettant l'interprétation.

- La chitine (Poly- $\beta$ -1,4-N-acétyl glucosamine) est présente dans la paroi des micromycètes et est absente du matériel végétal. Le principe du dosage de cette molécule, mis au point par Donald et Mirocha, en 1977 pour évaluer l'importance de la contamination fongique des grains, repose sur l'hydrolyse de la chitine en glucosamine, dosée par colorimétrie ou chromatographie (Donald et Mirosha, 1977). Les résultats obtenus peuvent être biaisés par des teneurs en chitine variable (de 1 à 25 % du poids sec du mycélium) selon les espèces, l'âge du mycélium et la nature du substrat (Matchman *et al.*, 1985). Les Polysaccharides extracellulaires (EPS) sont des polymères hydrocarbonés excrétés par la plupart des moisissures. Ils sont considérés uniquement comme marqueurs d'exposition, sans effets propres sur la santé (Chew *et al.*, 2001). Cette méthode est rapide et peu spécifique à une espèce, cependant il existe des réactions croisées entre les genres *Aspergillus* et *Penicillium* qui rendent difficile l'interprétation des résultats (Eduard et Heederik, 1998).
- La Polymerase Chain Reaction quantitative (PCRq) permet la quantification d'un gène cible. Celle-ci représente une méthode de choix pour avoir une vision quantitative de la diversité microbienne de l'air. La spécificité et la sensibilité de cette technique, conviennent à la détection et à la quantification des microorganismes aéroportés (Alvarez *et al.*, 1995; Stetzenbach *et al.*, 2004). Néanmoins, peu d'analyses globales des champignons existent dans l'air, par conséquent, la comparaison avec les données disponibles par culture reste difficile. Bien que la PCR quantitative ait été largement utilisée dans d'autres environnements (eau et sol) ou pour des études cliniques (Watzinger *et al.*, 2004), dans l'air, son utilisation a été limitée à la détection et à la quantification de genres (*Aspergillus*, *Penicillium*...) (Haugland *et al.*, 2004; Morrison *et al.*, 2004) ou d'espèces présentant un intérêt de santé publique (*Aspergillus fumigatus*, *Stachybotris chartarum*, *Alternaria alternata*...) (An *et al.*, 2006; Bellanger *et al.*, 2009; Fallschissel *et al.*, 2009). L'utilisation d'amorces dites « universelles » des principaux groupes de champignons permet la quantification globale de la charge fongique présente en aérosols. Bien qu'intéressante, cette démarche n'est pour le moment mise en pratique que pour les bactéries de l'air (Oppliger *et al.*, 2008; Rinsoz *et al.*, 2008).

## II.3 DETECTION DU DEVELOPPEMENT FONGIQUE PAR LES COV

Bouscaren définit les composés organiques volatils (COV) comme des substances dont la tension de vapeur à la température ambiante est suffisamment élevée pour estimer justifiée l'affirmation selon laquelle ces composés sont presque totalement à l'état de vapeur. La définition de la tension de vapeur seuil à partir de laquelle un composé organique est considérée être volatil est purement arbitraire (Bouscaren, 1998).

### II.3.A Emissions fongiques

L'étude des différentes phases de croissance des moisissures montre une production continue de métabolites et de produits de dégradation des supports. Des composés organiques volatils (COV) sont émis dès la germination, soit dès le début du développement des moisissures, et durant toutes les phases de croissances (Figure I-7) (Wessen *et al.*, 1995; Korpi *et al.*, 1997).

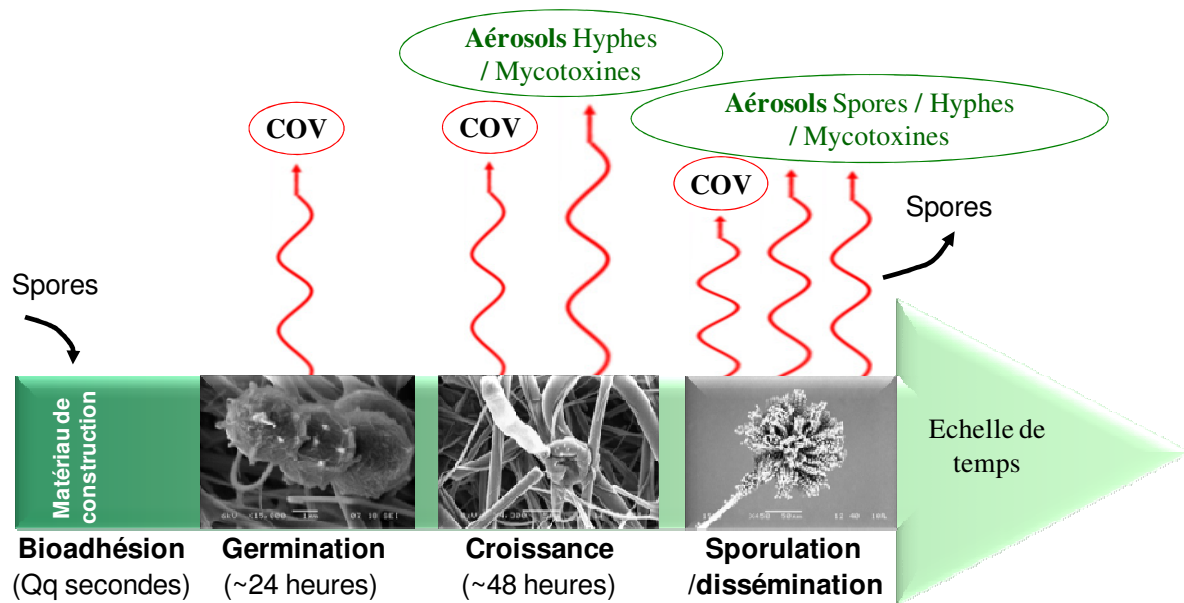


Figure I-7 : Emissions fongiques durant les phases de croissance d'une moisissure. D'après Moularat, 2005.

D'après Wilkins les COV issus de la biosynthèse des moisissures sont pour la plupart des molécules composées de 2 à 20 atomes de carbone. Parmi ces molécules, celles composées de 8 carbones ou plus pourraient être spécifiques d'une contamination fongique (par exemple le 3-octanol, le 3-octanone et le 1-octèn-3-ol résultent de la dégradation des acides gras) (Wilkins, 2002).

Plusieurs études ont également montré l'émission de COV, issus soit de la biosynthèse, soit de la biodégradation des supports, à partir de produits de construction contaminés (Ezeonu *et al.*, 1994; Wessen *et al.*, 1995; Pasanen *et al.*, 1996; Korpi *et al.*, 1998; Wilkins *et al.*, 2000; Schleibinger *et al.*, 2002; Wady *et al.*, 2002). Les composés identifiés appartiennent à différentes familles chimiques telles que les alcools, les cétones, les aldéhydes, les acides et les terpènes.

D'autres études ont montré que la nature des composés émis dépendait du substrat et de l'espèce fongique (Wilkins *et al.*, 2000; Schleibinger *et al.*, 2002; Moularat *et al.*, 2008c). Des mesures *in situ* ont mis en évidence des concentrations de COV dans les logements comprises entre 0,1 et 740  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  (Ström *et al.*, 1994; Wessen *et al.*, 1995; Fedoruk *et al.*, 2001; Keller *et al.*, 2001).

Pasanen, en 1996, démontre que la production de certains COV concorderait avec la formation d'autres métabolites secondaires (mycotoxines) (Pasanen *et al.*, 1996). A partir de plusieurs études portant sur la production de COV, le même auteur décrit la biosynthèse des principaux composés rencontrés (Figure I-8).



L'analyse par chromatographie en phase gazeuse sera employée pour les COV capturés par un adsorbant après désorption thermique.

### II.3.C Recherche d'une empreinte chimique spécifique

Les émissions de COV peuvent avoir 2 origines, le support et le métabolisme fongique. Dans le cas des COV issus du support, il s'agit soit de constituants du support dont la libération est favorisée par la biodégradation, soit de l'émission d'un même composé émis simultanément par le matériau et la moisissure.

Plusieurs auteurs ont suggéré d'utiliser ces composés en tant qu'indicateurs d'une croissance fongique dans des bâtiments (Miller *et al.*, 1988; Sunesson *et al.*, 1996; Korpi *et al.*, 1998; Bjurman, 1999; Fiedler *et al.*, 2001; Van Lancker *et al.*, 2008).

En 1994, Ström a mesuré, dans 2 habitations contaminées, les concentrations de 15 COV, spécifiques d'une contamination fongique ou bactérienne. Les concentrations relevées variaient de 2 à 15 600 ng/m<sup>3</sup> selon les composés (Ström *et al.*, 1994).

Keller, en 2001, réalise une étude, dans 131 habitations, afin de détecter des COV responsables de l'odeur de moisi. Les COV recherchés (1-octèn-3-ol, 2-méthyl-1-propanol, diméthylsulphide, diméthylsulfide, diméthylsulphoxide, 2-heptanone et géosmine) ont été identifiés dans les 96 résidences présentant un signe de contamination fongique (odeur ou visible) à des concentrations variant de 0,1 à 740 µg/m<sup>3</sup> (Keller *et al.*, 2001). Wessen en 1995 et Fedoruk en 2001, retrouve les mêmes gammes de concentration à partir de prélèvements réalisés dans des logements contaminés (Wessen *et al.*, 1995; Fedoruk *et al.*, 2001).

Cependant, la multitude des sources autres que fongiques pouvant émettre des COV dans un environnement intérieur (matériaux, revêtements, microorganismes divers...) crée un bruit de fond qui limite la détection des traceurs fongiques. En 1998, Pasanen a montré qu'un développement fongique n'induisait qu'une augmentation de 1 % de la concentration totale des composés en comparant la concentration globale de COV en présence d'une contamination fongique et celle d'environnements stériles (Pasanen *et al.*, 1998). La prédominance de l'émission liée aux matériaux sur celle émise par les moisissures a également été mise en évidence par Moularat *et al.* (2008b). De plus, différentes études ont montré que la nature des COV d'origine fongique dépendait de l'espèce et / ou du support de croissance (Ezeonu *et al.*, 1994; Wessen *et al.*, 1995; Wilkins et Larsen, 1995; Pasanen *et al.*, 1996; Korpi *et al.*, 1997; Korpi *et al.*, 1998; Wilkins *et al.*, 2000; Schleichinger *et al.*, 2002; Wady *et al.*, 2002).

A travers ces études, il apparaît qu'il n'existe pas un COV permettant à lui-seul de conclure sur la présence ou l'absence de moisissure dans un environnement intérieur. L'utilisation de COV comme traceurs d'un développement fongique impose donc la détection de plusieurs composés afin de tenir compte de la dépendance des molécules vis-à-vis du couple espèce / support mais également du bruit de fond rencontré dans les environnements intérieurs.

Aussi, afin d'utiliser ces composés comme traceurs, une méthode, se basant sur la détection de plusieurs COV issus du métabolisme fongique a été proposée sous la forme d'un indice de contamination fongique. La présence et/ou l'absence de chacun de ces traceurs est prise en compte dans un indice s'incrémentant en fonction de la spécificité de chaque COV vis-à-vis du couple espèce / support (Moularat, 2007).

Ainsi, l'identification de 18 traceurs chimiques spécifiques (Tableau I-1) a permis d'établir cet indice de contamination. Sa construction tient compte des observations suivantes :

- Les COV issus de la biodégradation ne permettent pas de conclure sur la présence d'une croissance fongique, car ils sont susceptibles d'être à l'origine de toutes les autres formes de dégradation.
- La présence de COV issus du métabolisme fongique qui seraient indépendants de l'espèce et du substrat rend probable l'existence d'une contamination. L'absence de ces composés la rend peu probable.
- La présence de COV du métabolisme dépendant de l'espèce ou du matériau implique le développement. L'absence de ces composés ne permet pas de conclure.

La méthode d'incrémentation des indices est schématisée sur la Figure I-9 :

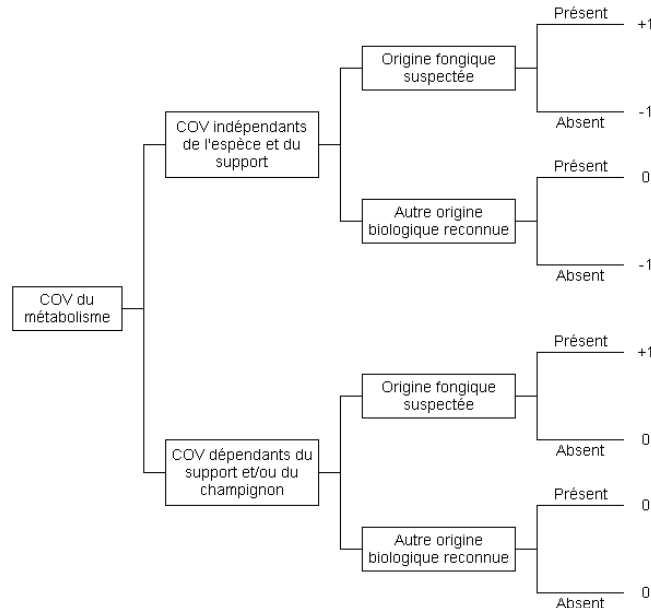


Figure I-9 : Incrémentation de l'indice chimique de contamination fongique (Moularat, 2007)

Tableau I-1 : Valeur d'incrémentation de l'indice de contamination pour chaque COV du métabolisme (modifier de Moularat, 2007)

COV issus du métabolisme	Incrémentations de l'indice		Observations
	Présent	Absent	
1,3-octadiène 1-octen-3-ol	1	-1	COV du métabolisme indépendant de l'espèce et du substrat
2-méthylfuran 3-méthylfuran 3-méthyl-1-butanol 2-méthyl-1-butanol $\alpha$ -pinène	0	-1	COV du métabolisme indépendant de l'espèce et du substrat dont l'existence d'autres sources autres que fongiques reconnues dans la littérature limite leur interprétation à leur seule absence
2-heptène diméthylsulfide 4-heptanone 2(5H)-furanone 3-heptanol Méthoxybenzène Méthyl-2-éthylhexanoate	1	0	COV du métabolisme dépendant du substrat et/ou de l'espèce. Leur interprétation est limitée leur seule présence

L'interprétation de cet indice permet de conclure sur la présence (indice positif) ou l'absence (indice négatif) d'une contamination. La valeur de cet indice est comprise entre -7 (aucuns traceurs) et +15 (tous les traceurs), cependant il est peu probable que l'ensemble des traceurs soient présents, même dans le cas d'une contamination fongique. La valeur absolue de cet indice n'est pas proportionnelle à un niveau de contamination mais est liée à une probabilité de présence fongique.

Cet indice de contamination a été validé *in situ* dans 496 logements lors de la campagne nationale de l'Observatoire de la Qualité de l'Air Intérieur (Moularat *et al.*, 2008a). De la même façon, l'indice a été appliqué à 94 logements dans la région de Clermont-Ferrand dans le cadre de l'étude ISAAC (Hulin *et al.*, 2010) ainsi que dans une étude sur des sites patrimoniaux (Joblin *et al.*, 2010a).

## CHAPITRE II : RECHERCHE DE TRACEURS ADAPTES A LA SURVEILLANCE DES SITES PATRIMONIAUX

Afin de détecter l'ensemble des contaminations fongiques, notamment dans le cas de croissances récentes ou cachées, un indice basé sur l'identification de COV, a été développé et breveté par le CSTB en 2007 (II.3.C). Cette méthode s'appuie sur des prélèvements par adsorption, une analyse chromatographique (GC/MS) et le calcul d'un indice de contamination.

Cette thèse a pour ambition de prolonger ces travaux en développant notamment un système de microcapteurs chimiques adapté à la mesure *in situ*. La recherche de nouveaux traceurs, en lien avec la nature des substrats contaminés, permettant le cas échéant d'orienter le diagnostic en identifiant les supports dégradés, constitue un préambule à l'élaboration du microsystème.

Ce chapitre vise ainsi à identifier les COV émis lors d'une croissance fongique sur des matériaux vulnérables en lien avec la protection du patrimoine. Cette recherche a été réalisée en collaboration avec le Laboratoire de Recherche des Monuments Historiques (LRMH), service du Ministère de la Culture et de la Communication dont la principale mission est de mener des recherches sur la conservation des monuments et objets du patrimoine culturel. Dans ce cadre, le LRMH a proposé gracieusement pour l'étude quatre matériaux (lin, colle peau de lapin, essence de bois et argile) fréquemment détériorés ainsi que neuf souches (8 deutéromycètes et 1 basidiomycète) isolées de ces mêmes supports.

Après une brève caractérisation du montage expérimental, la démarche adoptée a consisté à identifier les composés émis par les supports hors développement fongique. Dans le même temps, les émissions liées à la prolifération des fongiques sur ces mêmes supports ont été évaluées. Ainsi, les émissions intrinsèques des supports sont différenciées de celles liées spécifiquement au développement fongique. Les COV identifiés sont ensuite catégorisés en fonction de leur origine synthétique afin de définir une liste de traceurs chimiques signant la présence d'un développement fongique sur des supports spécifiques.

La nature des COV produits par les différentes souches ainsi que leur rôle dans le métabolisme fongique, ne seront pas discutés dans ce mémoire. La liste exhaustive des composés identifiés est en Annexe III du document et disponible pour une exploitation ultérieure.

Notre analyse se concentrera sur la capacité du microsystème à détecter les principaux COV identifiés.

### I MATERIELS ET METHODES

#### I.1 SOUCHES

Neuf souches sauvages, identifiées par le Muséum National d'Histoire Naturelle (Département de Systématique), ont été employées pour cette étude: 8 deutéromycètes dont *Aspergillus sydowii*, *Penicillium solitum*, *Penicillium brevicompactum*, *Trichoderma komingii* et *Ulocladium alternariae* sur un support en lin ; *Penicillium brevicompactum* et *Penicillium corylophilum* sur de la colle peau de lapin et *Fusarium solani* sur de l'argile des grottes de Lascaux ; et 1 basidiomycète, *Phellinus megaloporus*, sur du hêtre (Figure II-1).

Des agrandissements des souches dont l'espèce n'a pas été identifiée sont proposés en Annexe I.



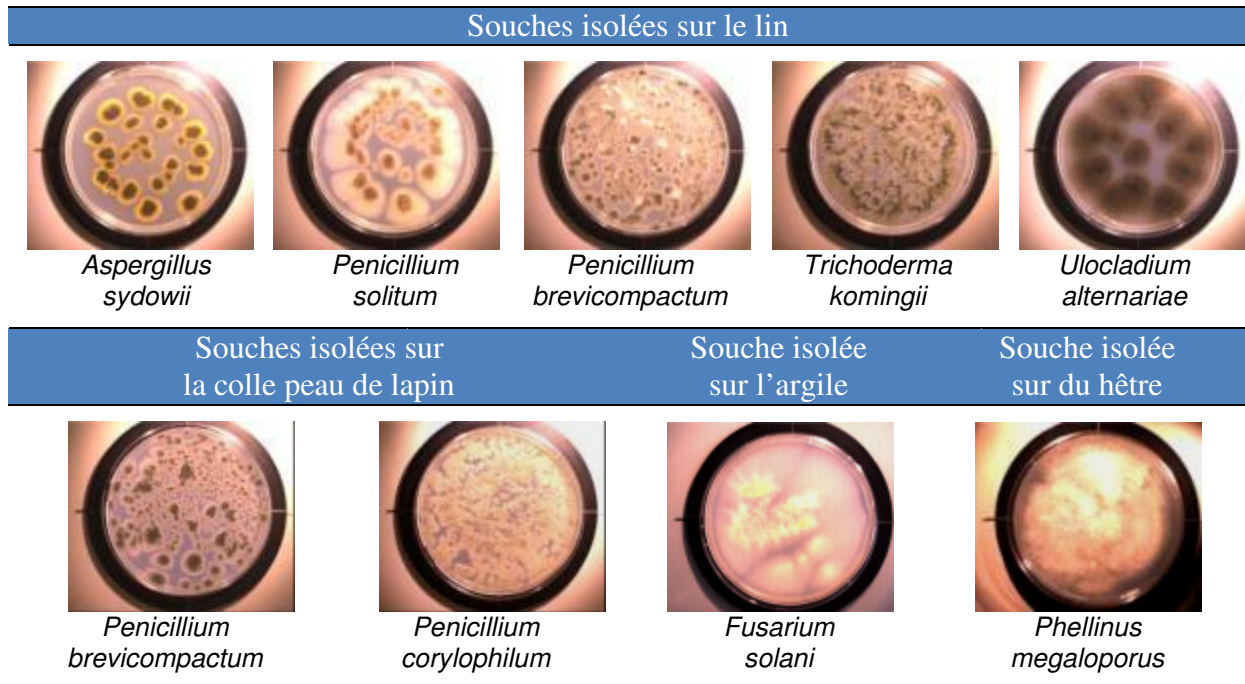


Figure II-1 : Photographies des souches de l'étude cultivant sur milieu S10 (après 7 jours d'incubation à 25°C)

Ces souches ont été repiquées sur milieu de culture S10 (3g de bouillon de Sabouraud glucosé à 2 % dilué, 20g d'agar, 1g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1g MgSO<sub>4</sub> et 1 litre d'eau ultra pure) et incubées pendant 7 jours à 25°C à l'obscurité (étuve Incucell, Fisher Bioblock). Les échantillons sont conservés durant 3 mois à 4°C à l'obscurité dans 1 mL d'eau ultra pure filtrée.

## I.2 SUPPORTS DE CROISSANCE

Deux types de support ont été utilisés au cours de ces travaux : un support modèle peu émissif et quatre supports identifiés par le LRMH comme vulnérables vis-à-vis de la contamination fongique.

Le support modèle utilisé pour déterminer les COV non spécifiques du support est un filtre en fibre de verre compressée sans liant découpé en éprouvettes de 2 × 5 cm de 0,7 mm d'épaisseur (Whatman, GF/B, VWR International). Après stérilisation (121°C pendant 45 min à chaleur humide), les filtres sont encrassés à l'aide de 20 ml d'une solution nutritive composée d'une source de carbone (glucose), d'azote (nitrate de sodium) et d'oligoéléments. Le pH est fixé à l'aide de solutions tampons stériles exemptes de carbone et d'azote (1g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 g de KCl, 0,5 g de MgSO<sub>4</sub>/7H<sub>2</sub>O, 0,01 g de FeSO<sub>4</sub>/7H<sub>2</sub>O, 31,5 g de glucose, 3,5.10<sup>-2</sup> g/L de NaNO<sub>3</sub> et 1 L de solution tamponnée à pH=7 constituée de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> et NaOH).

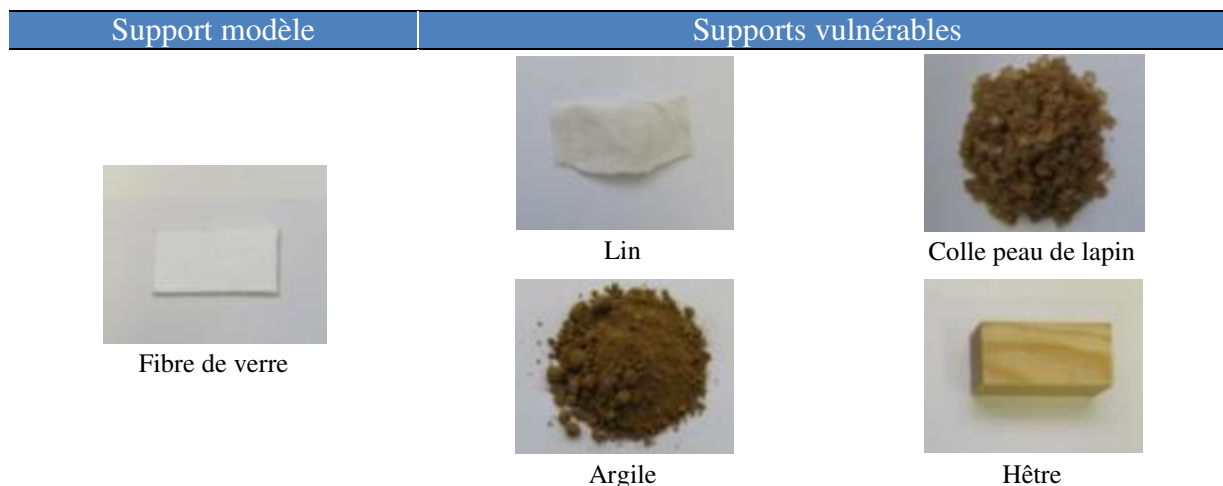


Figure II-2 : Photographies des supports de croissance identifiés par le LRMH

Les quatre supports vulnérables sont :

- du lin sous forme de morceau de tissu (*Socotex*). L'utilisation de cette matière comme textile devient fréquente dès le début du moyen-âge, ainsi, de nombreux vêtements et tissus de décoration liés au patrimoine en sont constitués.
- de la colle peau de lapin en granules (*ctseurope*). Il s'agit d'un produit de restauration d'œuvre d'art courant. Cette colle de nature protéique est obtenue par la mouture de peaux de lapins, soluble dans l'eau. Une des principales utilisations de la colle de peau de lapin est la préparation des surfaces pour la restauration de fresques et de peintures sur toile et sur bois. Elle est utilisée en restauration pour son caractère réversible.
- de l'argile du site des grottes de Lascaux. Elle a été prélevée sur une banquette du diverticule de droite de la grotte de Lascaux. Cette argile est composée essentiellement de minéraux comme l'illite, la kaolinite et la smectite. Afin de garder une constitution constante des éprouvettes durant toute l'étude, l'argile récoltée a été dès le départ concassée puis homogénéisée.
- du hêtre en tasseau (*scierie de Tournan en Brie*). Essence de bois feuillue utilisée dans les œuvres (cadre de tableau par exemple) susceptibles d'être contaminées par des basidiomycètes.

La colle peau de lapin est diluée au 2/3 (v/v) dans de l'eau ultra pure afin d'obtenir un « gel » homogène. Le lin est découpé en morceaux de 2 × 5 cm et le hêtre en tasseau de 2,5 × 1,5 × 5 cm. Tous les matériaux sont stérilisés à 121°C durant 45 min à chaleur humide.

### I.3 CHAMBRES D'EMISSION

Des chambres d'émission (Figure II-3) inertes vis-à-vis des COV (verre et PTFE), ont été utilisées. Elles se composent de flacons carrés (B0826/0047, *Schott*) modifiés par l'ajout de deux robinets PTFE 4 mm et de deux bouchons percés munis d'un anneau étanche coulissant SVL 15 (*Belleville*). Les chambres sont fermées à l'aide de bouchons PBT rouge (GL45, *Schott*) munis d'un joint d'étanchéité en PTFE. Le volume des chambres ainsi constituées est de 300 mL (goulot et robinetterie compris).

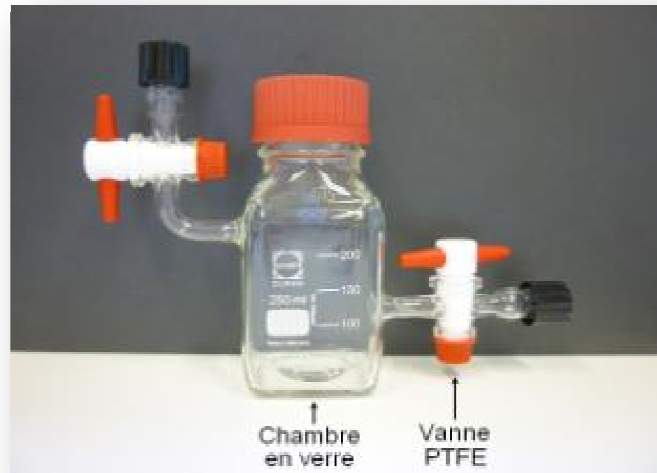


Figure II-3 : Photographie d'une chambre d'émission

Des billes de verre d'un diamètre de 6 mm (00137206, *Belleville*) sont ajoutées dans les chambres ainsi que de l'eau déionisée filtrée. Comme pour les supports de croissance, les chambres et les billes de verre sont également stérilisées à 121°C pendant 45 min à chaleur humide avant utilisation.

Après disposition des matériaux dans les chambres, les taux de charges obtenus sont de :

- $7.10^{-2} \text{ cm}^2/\text{cm}^3$  pour la fibre de verre, le lin et l'argile
- $9.10^{-2} \text{ cm}^2/\text{cm}^3$  pour l'hêtre

#### I.4 PROCEDURE DE CONTAMINATION

Avant de procéder à la contamination des supports, deux subcultures sont réalisées : la première sur milieu S10 (7 jours d'incubation à 25°C à l'obscurité) dans une étuve Incucell, (*Fisher Bioblock*), la seconde sur milieu à base d'avoine et d'agar (Oatmeal-Agar : 60g d'avoine (Celnat), 12,5g d'agar et 1 litre d'eau ultra pure) dans des conditions d'incubation identiques.

La procédure de contamination (Annexe II) se décompose selon 4 étapes :

- Une suspension de spores est réalisée pour chaque souche. Les spores sont récoltées sur le milieu de culture puis diluée dans 50 mL d'eau ultra pure. L'absence d'influence de la concentration initiale en spores de la suspension sur la nature des COV émis ayant été vérifiée lors d'une étude antérieure (Moularat, 2005), cette concentration n'a pas été mesurée lors de cette étape.
- La fibre de verre est encrassée à l'aide de 20 mL de solution nutritive.
- Les chambres d'émissions sont préparées (Figure II-4): Pour la fibre de verre, le lin et le bois, 50 mL de billes de verre et 5 mL d'eau ultra pure sur les billes sont déposés dans une chambre dont les vannes sont fermées avant dépôt du matériau sur les billes. Pour l'argile, 5 mL d'eau ultra pure sont versés sur les 50 mL d'argile disposé au fond de la chambre dont les vannes sont fermées. Pour la colle peau de lapin, 50 mL de colle

chauffée au bain-marie à 90°C sont versés dans une chambre dont les vannes sont également fermées.

- Les chambres sont ensuite conditionnées. 5 mL de la suspension de spores sont répartis sur les matériaux « contaminés » et 5 mL d'eau ultra pure (système de purification d'eau Neptune, muni de filtre select NCP, *PurIte*) sur les matériaux « témoins ». Les chambres sont ensuite fermées et les vannes ouvertes afin de faire passer de l'air filtré sur charbon actif (élimination de COV présents avant le début de la croissance) pendant 30 min. Les chambres sont alors placées à l'étuve (Incucell, *Fisher Bioblock*) durant 7 jours à 25°C et à l'obscurité. L'humidité est maintenue à saturation durant tout l'essai.

Toutes ces manipulations sont réalisées sous hotte à flux laminaire.



Figure II-4 : Photographie d'une chambre d'émission sur le support modèle (contaminée par *P. brevicompactum* et témoin).

Pour chaque souche fongique, 12 chambres ont donc été réalisées. 6 chambres avec le support modèle (fibre de verre) dont 3 contaminées et 3 témoins, et 6 avec le matériau de support spécifique de la souche (Lin, colle peau de lapin, argile ou hêtre) dont 3 contaminées et 3 témoins.

## I.5 ECHANTILLONNAGE ET ANALYSE

Le montage expérimental (Figure II-5) est constitué d'une chambre d'émission dans laquelle est placé un support stérile ou contaminé et en sortie, un tube en acier inoxydable de 90 mm de longueur et 5 mm de diamètre interne (Perkin-Elmer) contenant un adsorbant solide (TENAX TA, 200 mg par tube), assure le piégeage des COV. L'adsorbant utilisé est un polymère poreux à base d'oxyde de 2,6-diphénylène dont la granulométrie varie de 0,18 mm à 0,25 mm.

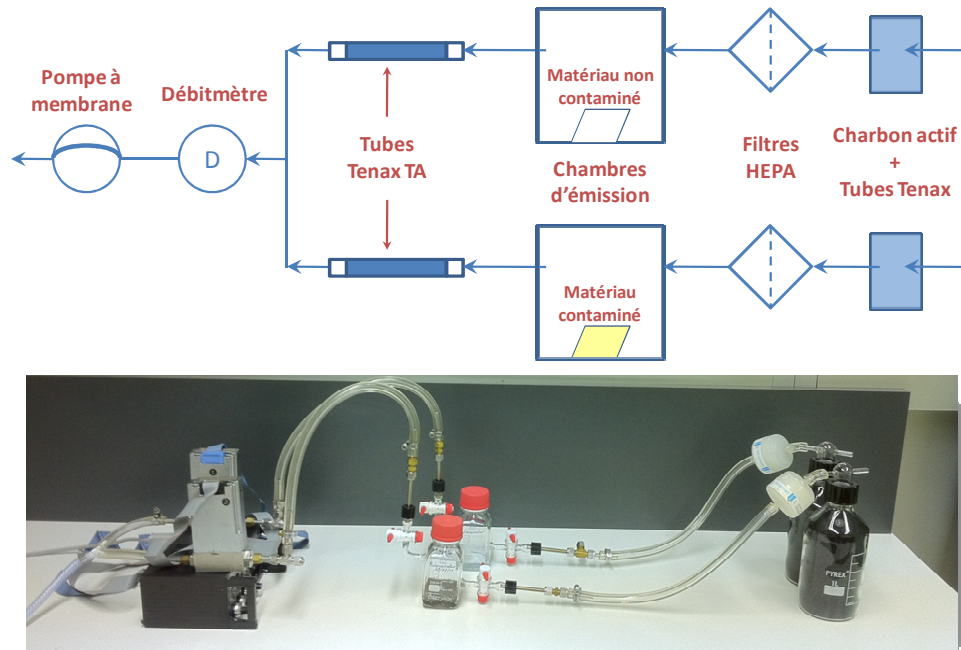


Figure II-5 : Schéma de principe et photographie du montage expérimental

Une chaîne de filtration composée de charbon actif, d'un tube TENAX et d'un filtre anti-particulaire (HEPA) est située en amont de la chambre d'émission et assure un renouvellement d'air « propre » tandis qu'une pompe, placée en aval de la chambre, permet le prélèvement à un débit de 100 mL/min pendant 30 min. L'ensemble des connexions (tubes, raccords) sont en PTFE non émissif. La comparaison entre échantillons contaminés et non contaminés permet d'isoler les traceurs issus du développement fongique.

La chaîne analytique est composée d'une chromatographie en phase gazeuse (GC) pour séparer les COV et d'un spectromètre de masse (MS) pour les identifier. Les chromatogrammes et spectres obtenus sont comparés à une bibliothèque spectrale (NIST, 1998). Les caractéristiques de la chaîne d'analyse sont précisées dans le Tableau II-1.

Tableau II-1 : Caractéristiques de la chaîne analytique GC/MS

Paramètres	Conditions analytiques
Thermo-désorbeur	Perkin Elmer ATD 400
Température de désorption	260 °C
Débit d'azote	50 mL/min
Durée de désorption	15 min
Température du piège secondaire	de -30 à 280°C (15 min)
Température de la ligne de transfert	220°C
Chromatographe gaz / Spectromètre de masse	VARIAN GC 3800 / MS Saturn 2000
Cycle de température	40°C pendant 5 min 2,5°C / min jusqu'à 170°C 7,5°C / min jusqu'à 250°C 250°C pendant 13 min
Colonne capillaire	DB-5 ms longueur : 60 m diamètre interne : 0.25 mm épaisseur de la phase : 1 µm
Paramètres du spectromètre de masse	Trappe (MS Saturn 2000) 70 eV 33-425 amu

Chaque analyse est répétée 3 fois et les mesures de matériaux contaminés sont systématiquement reproduites avec le même support non contaminé (témoin).

## II RESULTATS

### II.1 CARACTERISATION DU MONTAGE EXPERIMENTAL

#### II.1.A Mesure du blanc de chambre

La limite de détection des COV ( $LD$ ) à été déterminée en ajoutant à la moyenne du bruit de fond ( $moy_b$ ), 3 fois l'écart type du bruit ( $\sigma_b$ ) :

$$LD = moy_b + 3\sigma_b$$

Un chromatogramme issu d'une chambre d'émission ne contenant ni matériaux ni moisissure est présenté en Figure II-6.

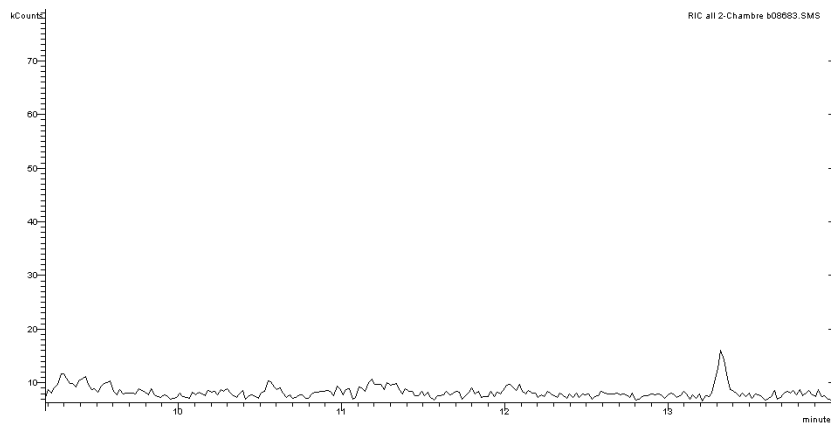


Figure II-6 : Chromatogramme d'un blanc de chambre

Ainsi, cette LD a été estimée à 0,67 ng équivalent Toluène ( $n=15$  ;  $moy_b=0.21$  ;  $\sigma_b=0,15$ ).

La dispersion des mesures (répétabilité), définie comme le rapport de l'écart à la moyenne, a été évaluée à partir des fluctuations constatées lors des différentes analyses du 2-méthylfurane ( $n=12$ ) :

$$Dispersion = \frac{\sigma}{moy} \cdot 100 = 3\%$$

La superposition de trois chromatogrammes issus de fibre de verre contaminées par *Penicillium* est présentée Figure II-7.

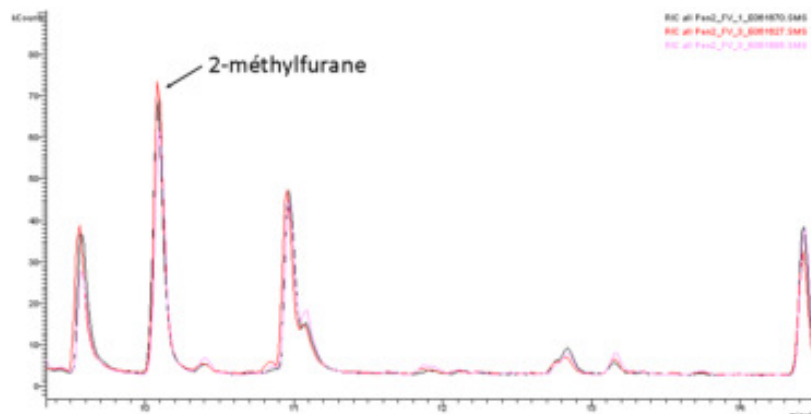


Figure II-7 : Superposition de 3 chromatogrammes issus de fibre de verre contaminée par *Penicillium*



Cette dispersion tient compte de la manipulation, l'analyse et les variations dues à la croissance des microorganismes. Dans cette étude, seuls les composés ayant une aire de pic supérieure à 3 fois la valeur de l'écart type du bruit ont été considérés. Cette limite a été définie à partir des fluctuations de la ligne de base constatée lors des différentes analyses.

### II.1.B Caractérisation des conditions de température et humidité

Durant le prélèvement (30 min à 100 mL/min) l'air des chambres d'émission est renouvelé 10 fois. Après 30 min de prélèvement, l'absence de composés résiduels dans la chambre a été vérifiée.

Afin de vérifier la stabilité des conditions environnementales durant l'essai, les temps d'équilibre de l'humidité relative et de la température à l'intérieur d'une chambre d'émission ont été évalués. Les mesures de ces paramètres sont présentées sur la Figure II-8.

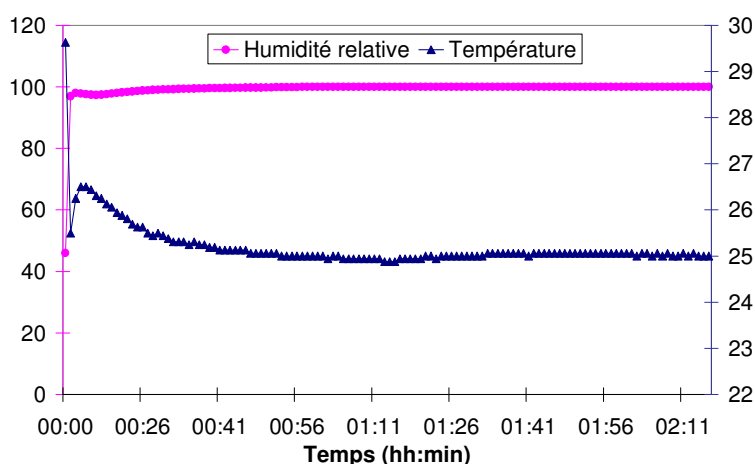


Figure II-8 : Conditions d'humidité et température mesurées à l'intérieur d'une chambre d'émission

L'équilibre de l'humidité relative est atteint en 13 min (proche de 100 %) et celui de la température en 30 min (25°C). Ces temps étant négligeables par rapport à la durée d'incubation choisie (7 jours), les conditions environnementales sont considérées comme constantes durant la croissance.

## II.2 EMISSIONS CHIMIQUES DES PRODUITS DE CONSTRUCTION

Comme attendu, le matériau de référence, la fibre de verre additionnée de solution nutritive, n'a pas émis de COV. Pour les autres supports testés, 286 composés ont été identifiés à partir du hêtre, 176 composés avec la colle peau de lapin, 125 avec l'argile du site de Lascaux et 120 avec le lin. A titre d'exemple, nous avons recensé dans le Tableau II-2 les 10 composés majoritaires (triés par concentrations décroissantes).

La nature des COV majoritaires retrouvés sur le lin, la colle et l'hêtre, sont des composés fréquemment rencontrés dans les environnements intérieurs tels que l'habitat (Kirchner *et al.*, 2006). Cependant, certains composés semblent spécifiques des supports étudiés. Ainsi, le 2,4-diméthyl-1-heptène et le 2,6-diméthyl-7-octen-2-ol sont 2 composés associés au lin, le 4-chloro-3-méthyl-phenol et le 2,4-diméthyl-1-heptène sont 2 composés associés à la colle peau de lapin et enfin le 3,5-diméthyl-1-hexène est associé à l'hêtre.



Dans le cas de l'argile de Lascaux, seuls trois des dix composés majoritaires ont été référencés dans des environnements intérieurs, le 1,3,5-tris(triméthylsiloxyl)benzène, le 4-méthyl-heptane et l'hexanal. Cette différence se retrouve sur l'ensemble du chromatogramme et montre que d'un point de vue composition chimique, cet environnement se singularise des environnements intérieurs.

Tableau II-2 : 10 COV majoritaires émis par chaque support en l'absence de contamination fongique (l'ensemble des essais est réalisé en triplicata)

Lin	Colle peau de lapin	Argile de Lascaux	Hêtre
Sesquiterpene (MW 204)	4-chloro-3-methyl-phenol	4-nonene	3,5-dimethyl-1-hexene
Sesquiterpene (MW 204)	2,4-dimethyl-1-heptene	1,3,5-tris(triméthylsiloxyl)benzene	1-Decene
Sesquiterpene (MW 204)	2-pentyl-furane	Decamethyl-cyclopentasiloxane	Sesquiterpene (MW 204)
Sesquiterpene (MW 204)	Acetone	Trimethyl-silanol	Hexanal
3-carene	Hexanal	4-methyl-heptane	Nonanal
Camphre	2,3-dimethyl-hexane	Tetradecamethyl-cycloheptasiloxane	Octanal
1-propoxy-2-propanol	1-pentanol	2,6,10-trimethyl-tetradecane	Benzaldehyde
2,4-dimethyl-1-heptene	3-methyl-hexane	Hexamethyl-cyclotrisiloxane	$\alpha$ -pinene
Linalyl isobutyrate	2-ethyl-furane	Hexanal	1-pentanol
2,6-dimethyl-7-octen-2-ol	2-methyl-1-pentene	Octamethyl-cyclotetrasiloxane	Furfural

Certains COV ont été associés dans la littérature à la présence de moisissures, notamment le 2-éthylhexanol et le benzène (Ezeonu *et al.*, 1994; Sunesson *et al.*, 1996; Schleibinger *et al.*, 2002). Ces composés, bien qu'ils ne soient pas présents dans les 10 composés majoritaires (Tableau II-2), sont émis par les 4 supports testés. Leur présence révélée par la littérature peut s'expliquer par l'altération des supports. En effet, durant leur développement, les moisissures altèrent les matériaux qu'elles colonisent par des actions mécaniques (croissance du mycélium dans la matrice du matériau) ou biochimiques (libération d'enzymes, d'acides...). Cette dégradation de la matrice s'accompagne de la libération de COV dans l'environnement. Ces derniers sont peu spécifiques car susceptibles d'être émis quel que soit le type de dégradation (suite au vieillissement du matériau par exemple).

## II.3 EMISSIONS CHIMIQUES D'ORIGINE FONGIQUE

### II.3.A Démarche analytique

Les chromatogrammes des matériaux présentant un développement fongique ont été comparés systématiquement à ceux du même matériau hors contamination. La superposition du chromatogramme issu du lin avec celui du même matériau contaminé par *Aspergillus sydowii* est présentée pour exemple sur la Figure II-9.

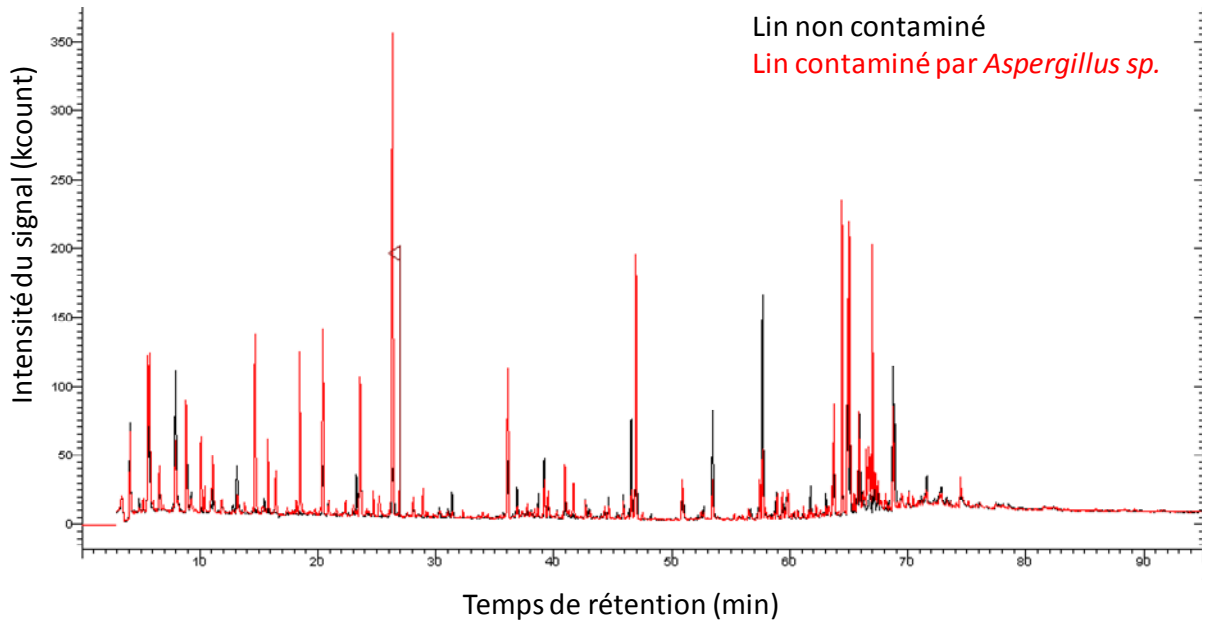


Figure II-9 : Chromatogrammes superposés des émissions du lin sans (tracé noir) et avec développement d'*Aspergillus sydowii* (tracé rouge).

A l'échelle du chromatogramme de la Figure II-9, il est difficile d'analyser les différences entre les matériaux contaminés et non contaminés. La caractérisation est réalisée à une échelle beaucoup plus fine. Sur la Figure II-10 est présenté les faibles émissions d'une section du précédent chromatogramme : entre 7,5-22,5 min en abscisse et 0-100 kcounts en ordonnée.

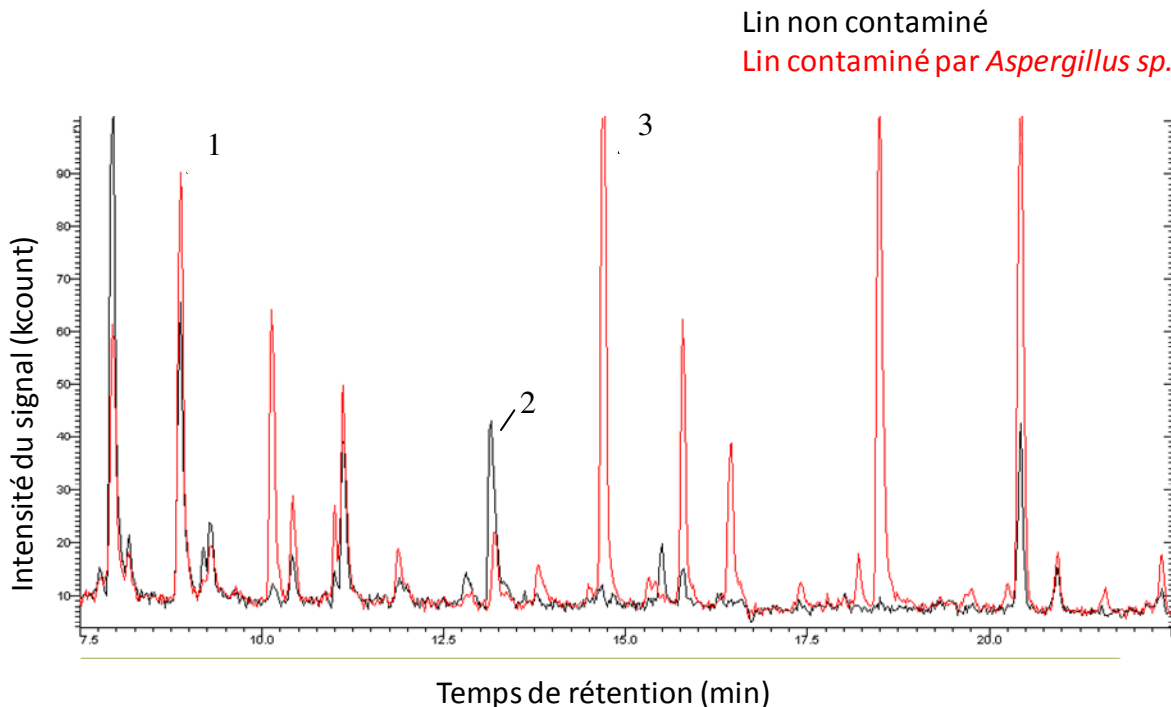


Figure II-10 : Agrandissement du chromatogramme Figure II-9 pris entre 7,5-22,5 min en abscisse et 0-100 kcounts en ordonnée

A cette échelle, des profils d'émission différents sont constatés. Les disparités observées se distinguent selon 3 cas :

- pic 1 : la proportion du COV déjà présent sur le matériau de référence augmente. Il s'agit soit d'un constituant du support dont la libération est favorisée par la biodégradation, soit des émissions d'un même composé émis simultanément par le matériau et la moisissure qui sont sommées.
- pic 2 : la proportion du COV déjà présente sur le matériau de référence diminue. Le composé est alors très certainement consommé par le microorganisme ou il se transforme suite à une réaction avec un composé produit par le champignon.
- pic 3 : un nouveau COV apparaît. Il s'agit alors de composés liés au métabolisme de la moisissure.

Seuls les COV du métabolisme seront pris en compte (cas 3) dans le reste de l'étude. Les cas 1 et 2, qui correspondent à la disparition d'un COV ou l'émission d'un COV par un support non contaminé ne pouvant être utilisé comme traceur.

### II.3.B Recherche des traceurs spécifiques aux substrats

L'identification des COV du métabolisme fongique émis spécifiquement selon les substrats considérés, est présentée dans les tableaux II-3, II-4, II-5 et II-6. La liste exhaustive des composés identifiés est en Annexe III du document et disponible pour une exploitation ultérieure.

Tableau II-3 : Identification des composés spécifiques issus du **lin** contaminé par *Aspergillus sydowii*, *Penicillium solitum*, *Penicillium brevicompactum*, *Trichoderma komingii* et *Ulocladium alternariae*

Composés	<i>Aspergillus sydowii</i>		<i>Penicillium solitum</i>		<i>Penicillium brevicompactum</i>		<i>Trichoderma komingii</i>		<i>Ulocladium alternariae</i>		
	FV	Lin	FV	Lin	FV	Lin	FV	Lin	FV	Lin	
3-méthyl-2-butanone											+
3-butyn-1-ol					+						
4-méthyl-1-heptène					+		+				
tétrahydro-2,2,5,5-tétraméthylfurane					+		+				
2-éthyl-2-hexenal							+				
1-octèn-3-one					+						

Tableau II-4 : Identification des composés spécifiques de la **colle peau de lapin** contaminée par *Penicillium brevicompactum* et *Penicillium corylophilum*

Composés	<i>Penicillium brevicompactum</i>		<i>Penicillium corylophilum</i>	
	FV	Colle PDL	FV	Colle PDL
Méthyl-2-méthylbutanoate			+	+

Tableau II-5 : Identification des composés du métabolisme fongique spécifiques de l'**argile** de Lascaux contaminée par *Fusarium solani*

Composés	<i>Fusarium solani</i>	
	FV	Argile Lascaux
1,3,5-heptatriène		+
3-hexanone		+
2-pentenal		+
4-méthyl-4-hexèn-3-one		+
2-éthylhexanal		+

Tableau II-6 : Identification des composés du métabolisme fongique spécifiques de l'hêtre contaminé par *Phellinus megaloporus*

Composés	<i>Phellinus megaloporus</i>	
	FV	Hêtre
méthyléthanoate		+
3-méthyl-2-butanone		+
2,5-diméthylfurane		+
3-hexanone		+

Conjointement à ces émissions spécifiques du lin, de la colle peau de lapin, de l'hêtre et de l'argile de Lascaux, les composés du métabolisme des différents champignons ont été détectés sur de la fibre de verre (FV). La liste de ces composés est disponible en Annexe III.

Concernant l'argile et l'hêtre, seule une souche a été testée pour chacun d'eux. Dans le premier cas, il s'agit d'une contamination spécifique des grottes de Lascaux ne faisant intervenir qu'une espèce dans un environnement avec un bruit de fond connu et stable.

Dans le second cas, seule une contamination par *Phellinus megaloporus* était recherchée puisque, d'après les constatations *in situ* du LRMH, une contamination par des basidiomycètes s'accompagne généralement de la présence de cette espèce. Aussi, pour ces deux cas particuliers, deux indices dédiés seront développés.

Concernant les deutéromycètes, une nouvelle bibliothèque de composés issus du métabolisme fongique peut être implémentée à la base de données existante. Cette nouvelle base de données permet d'obtenir une liste de traceurs chimiques d'une contamination fongique adaptée à un plus grand nombre d'environnements intérieurs. De ces nouvelles manipulations, quinze nouveaux composés se distinguent et permettent de renforcer l'Indice de Contamination Fongique (ICF) élaboré en 2005 par Moularat (Tableau II-7).

Tableau II-7 : Construction de l'Indice de Contamination Fongique renforcé par les nouveaux composés\* du métabolisme détectés par croissance des champignons sur FV, Lin et colle  
(les composés indépendants de l'espèce et du substrat sont surlignés en bleu, les composés dont une autre source que fongique est connue sont surlignés en vert, les composés dépendants de l'espèce et/ou du support ne sont pas surlignés)

COV issus du métabolisme	Incrémentations de l'indice		Observations
	Présent	Absent	
1,3-octadiène 1-octen-3-ol	1	-1	COV du métabolisme indépendant de l'espèce et du substrat
2-méthylfuran 3-méthylfuran 3-méthyl-1-butanol 2-méthyl-1-butanol $\alpha$ -pinène	0	-1	COV du métabolisme indépendant de l'espèce et du substrat dont l'existence d'autres sources autres que fongiques reconnues dans la littérature limite leur interprétation à leur seule absence
2-heptène diméthylsulfide 4-heptanone 2(5H)-furanone 3-heptanol Méthoxybenzène Méthyl-2-éthylhexanoate 3-méthyl-2-butanone * 3-butyn-1-ol * 4-méthyl-1-heptène * 2-éthyl-2-hexenal * tetrahydro-2,2,5,5-tetraméthylfuran * 1-octen-3-one * Méthyl-2-éthyl-3-hydroxyhexanoate * Méthyl-2-méthylbutanoate * 1,4-heptadiène * 3-pentanone * Ethyl-2-méthylpropanoate * Ethyl-2-méthylbutanoate * 4-méthyl-2-hexanone * Terpinolène * 1,3,6-heptadiène *	1	0	COV du métabolisme dépendant du substrat et/ou de l'espèce. Leur interprétation est limitée à leur seule présence

### III DISCUSSION

#### III.1 RENFORCEMENT DE L'INDICE ET TRACEURS DES SUBSTRATS CONTAMINES

Une nouvelle bibliothèque spectrale issue du métabolisme fongique a été implémentée à la base de données existante (Moularat, 2005). L'indice de contamination fongique a ainsi été favorablement étendu à partir de 7 nouvelles souches environnementales colonisant usuellement les sites patrimoniaux, avec l'identification de 15 nouveaux traceurs. La robustesse de cet indice sera testée *in situ* (Chapitre III).

Les COV spécifiques des matériaux seront utilisés en complément de l'indice de contamination fongique afin de déterminer le type de support contaminé dans le cas de contamination sur du lin ou de la colle peau de lapin. Pratiquement, un indice de contamination fongique positif associé à la présence d'une de ces cibles, est un indicateur de ces cas particuliers de contamination.

D'un point de vue pratique, le microsystème développé dans cette thèse devra disposer d'un module de séparation efficace permettant l'analyse de 29 composés. Cependant, les nouveaux composés détectés appartiennent aux mêmes familles que ceux identifiés précédemment (notamment alcènes, cétones et esters). De ce fait, la similarité de polarité permet l'utilisation d'une même phase stationnaire dans le module de séparation.

Pour les mêmes raisons, le choix des polymères constituant le module de détection du système sera peu influencé par ces nouveaux composés.

#### III.2 DEFINITION D'INDICES SPECIFIQUES

Pour les cas particuliers de *Fusarium solani* contaminant la grotte de Lascaux et *Phellinus megaloporus* contaminant du bois, deux indices de contamination spécifiques ont été développés selon la méthode de construction employée par Moularat (2007). Le Tableau II-8 présente les valeurs d'incrémentations utilisées pour l'indice de contamination spécifique au développement de *F. Solani* sur l'argile de Lascaux. Le Tableau II-9 présente les valeurs d'incrémentations utilisées pour l'indice de contamination spécifique au développement de *P. megaloporus* sur l'hêtre. Le code couleur utilisé pour ces deux tableaux est identique à celui utilisé dans le Tableau II-7.

Tableau II-8 : Valeur d'incrémentation de l'indice de contamination spécifique au développement de *F. Solani* sur l'argile de Lascaux (« Indice Lascaux »)

Composés	Incrémentation de l'indice	
	Présence	Absence
1,3-octadiene 4-heptanone 1-octen-3-ol methyl-2-ethylhexanoate	+1	-1
2-methylfurane 3-methylfurane 2-methyl-1-butanol	0	-1
1,3,5-heptatriene 3-hexanone 2-pental 4-methyl-4-hexen-3-one 1-octen-3-one	+1	0

Tableau II-9 : Valeur d'incrémentation de l'indice de contamination spécifique au développement de *P. megaloporus* sur l'hêtre (« Indice Phellinus »)

Composés	Incrémentation de l'indice	
	Présence	Absence
1,3-pentadiene 2-pentanone	+1	-1
2-methyl-1-butanol 2-methylfurane 3-methyl-1-butanol 3-methyl-2-butanol dimethyldisulfide	0	-1
Acid acetic, methyl ester 3-methyl-2-butanone 2,5-dimethylfuran 3-hexanone	+1	0

Ces deux indices seront testés *in situ* dans différents sites patrimoniaux (Chapitre III).

## CHAPITRE III : STRATEGIE D'ECHANTILLONNAGE ET DETECTION DES TRACEURS IN SITU

### I MATERIEL ET METHODES

#### I.1 ECHANTILLONNAGE

Les COV sont piégés dans des tubes en acier inoxydable de 9 cm de long, 5 mm de diamètre interne et 6 mm de diamètre externe, contenant du Tenax TA (15 g par tube). Un système déprimogène (FL-1001, Flec) est employé à un débit de 100 mL/min durant 30 min (Figure III-1).



Figure III-1 : Photographie du système de prélèvement actif (pompe et tube Tenax)

Un tube de diffusion de la marque Radiello (Fondazione Salvatore Maugeri, Clinica del Lavoro e della Riabilitazione – IRCCS, Centre de Recherche Environnementale, via Svizzera, 16 – I 35127 PADOVA) a également été employé.

La cartouche est cylindrique (40-60 mesh), de diamètre externe 4,8 mm, et contenant 300 mg de charbon graphité (Carbograph 4). Cette cartouche est placée avant le prélèvement dans un corps diffusif en polyéthylène (Figure III-2).

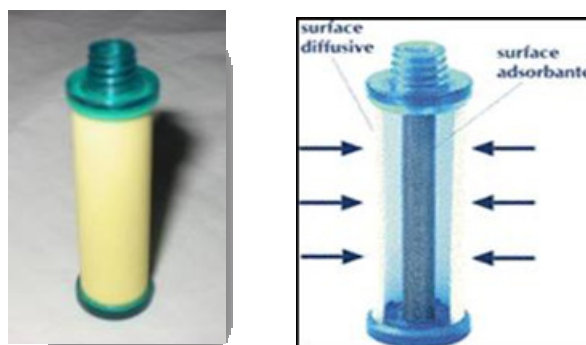


Figure III-2 : Photographie et schéma de principe d'un corps diffusif Radiello

Les tubes passifs sont exposés sur site durant 7 jours. Les cartouches sont conservées au réfrigérateur avant analyse.

#### I.2 ANALYSE

Les caractéristiques des chaînes d'analyses pour les prélèvements actifs et passifs sont précisées dans le Tableau III-1.



Tableau III-1 : Caractéristiques des chaînes analytiques GC/MS

Paramètres	Conditions analytiques	
	Tubes tenax	Tubes Radiello
Thermo-désorbeur	Perkin Elmer ATD 400	Perkin Elmer ATD TurboMatrix
Température de désorption	260 °C	370 °C
Débit d'azote	50 mL/min	50 mL/min
Durée de désorption	15 min	15 min
Température du piège secondaire	de -30 à 280°C (15 min)	de -30°C à 280°C (15 min)
Température de la ligne de transfert	220°C	220 °C
Chromatographe gaz / Spectromètre de masse	VARIAN GC 3800 / MS Saturn 2000	Autosystem XL / Perkin Elmer Turbomass
Cycle de température	40°C pendant 5 min	40°C pendant 1 min
	2,5°C / min jusqu'à 170°C	3°C / min jusqu'à 54°C
	7,5°C / min jusqu'à 250°C	54°C pendant 2 min
	250°C pendant 13 min	2,5°C / min jusqu'à 140°C
Colonne capillaire	DB-5 ms	CP Sil Pona CB
	longueur : 60 m	longueur : 50 m
	diamètre interne : 0.25 mm épaisseur de la phase : 1 µm	diamètre interne : 0.21 mm épaisseur de la phase : 0.5 µm
Paramètres du spectromètre de masse	Trappe (MS Saturn 2000)	Quadripôle
	70 eV 33-425 uma	Température source : 200°C

Les spectres obtenus sont comparés à une bibliothèque de spectres de masse (NIST, 1998).

## II RESULTATS

### II.1 STRATEGIE D'ECHANTILLONNAGE

#### II.1.A Diffusion d'un composé cible

Afin d'évaluer la diffusion des COV entre différentes pièces adjacentes d'un monument, un composé cible (le 1,4-dichlorobenzène, sous forme de pastille) a été placé dans une salle du **château de Champs-sur-Marne**, (salle 1) sur une commode à une hauteur de 1,50 m.

Ce traceur (non émis lors de la croissance fongique) a été mesuré dans 3 salles du château (Figure III-3) :

- Le salon chinois (salle 1) dans laquelle est placée la cible,
- une salle attenante à la salle, le salon rouge (salle 2),
- et une salle située au dessus de la salle 1, Le salon d'angle (salle 3).



Figure III-3 : Photographies des salles investiguées au château de Champs-sur-Marne

Trois prélèvements ont été effectués dans le salon chinois (salle 1), deux dans le salon rouge (salle 2), et enfin un dans le salon d'angle (salle 3). Un plan du site est présenté Figure III-4 et les conditions de prélèvements sont décrites dans le Tableau III-2. L'ensemble des prélèvements, d'une durée de 7 jours, ont été réalisés simultanément.

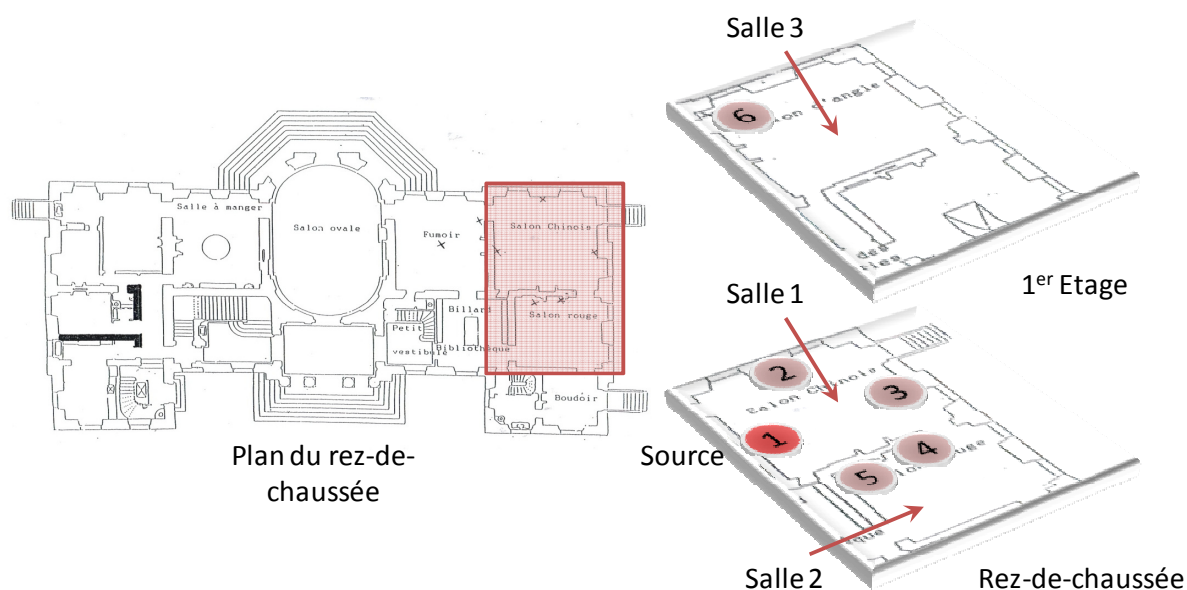


Figure III-4 : Schéma des points de prélèvements au château de Champs-sur-Marne

Tableau III-2 : Conditions de prélèvement dans le château de Champs-sur-Marne

N°	Position	Hauteur
1	Salle 1 - Mur 1	5 m
2	Salle 1 - Mur 2	1 m
3	Salle 1 - Mur 3	5 m
4	Salle 2 - Mur attenant à la salle 1	1,5 m
5	Salle 2 - Mur attenant à la salle 1	2,5 m
6	Salle 3 - coin de l'entrée	au sol

La mesure de concentration est normalisée par rapport à la source située dans la salle 1 (point de prélèvement n°1). Les résultats sont synthétisés dans le Tableau III-3.

Tableau III-3 : Résultats des mesures de concentration du traceur dans les différentes pièces

Salle	N°	Hauteur	Concentration normalisée
	1	5 m	1 (source)
1	2	1 m	0,81
	3	5 m	0,70
2	4	1,5 m	0,18
	5	2,5 m	0,19
3	6	au sol	0,16

Lors des deux mesures réalisées à 1,5 et 2,5 m de hauteur en salle n°2, les mêmes concentrations normalisées sont constatées. Des concentrations équivalentes sont également mesurées en salle n°1 à 1 et 5 m de hauteur (les variations observées étant expliquées par la diffusion horizontale). Aussi, ces résultats ne montrent pas d'influence de la hauteur de prélèvement sur la concentration de COV.

Un abaissement maximal de 30 % est observé à l'intérieur d'une même salle (salle n°1). Ainsi, une détection de COV cibles dans une salle est possible à partir d'un unique prélèvement.

Un abaissement d'environ 80 % est constaté entre 2 pièces adjacentes. Par ailleurs, les concentrations de COV fongiques dans les environnements intérieurs sont de l'ordre de  $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$  d'air (Moularat, 2005). Une détection des traceurs fongiques entre deux salles est donc possible à partir d'un prélèvement sur adsorbant suivi d'une analyse GC/MS. Dans ces conditions, le microsysteme devra permettre la détection de traceurs présents à des concentrations de l'ordre de  $2 \mu\text{g}/\text{m}^3$  d'air.

### II.1.B Diffusion des traceurs fongiques

Afin d'évaluer la diffusion des traceurs fongiques, deux environnements avec une source de contamination identifiée, ont été instrumentés : la **médiathèque de Château-Thierry** et la **Bibliothèque privée du château d'Escorpain**. Les contaminations fongiques ont été confirmées lors de la mise en culture de prélèvements de surface et d'air.

L'analyse des traceurs fongiques a alors été réalisée à proximité et à distance de la source de contamination, ainsi qu'au niveau de « zones de dilution » des COV probables (présence d'une porte et/ou d'une bouche d'aération).

Lors de la campagne de mesures effectuée à la **médiathèque de Château-Thierry** (Figure III-5), 6 prélèvements répartis dans un magasin (lieu de stockage de livres) ont été réalisés.



Figure III-5 : Photographies lors de la campagne de mesures effectuée à la médiathèque de Château-Thierry

Les points de prélèvement sont présentés Figure III-6. Trois hauteurs de prélèvement (au sol, à 1,5 m et au plafond) ont été choisies pour les différents points de mesures. L'ensemble des prélèvements, d'une durée de 30 min, ont été réalisés simultanément. Les conditions de prélèvements ainsi que les traceurs détectés sont présentés dans le Tableau III-4. Le prélèvement situé au niveau du plafond au point B se situe à proximité d'une bouche de soufflage d'air.

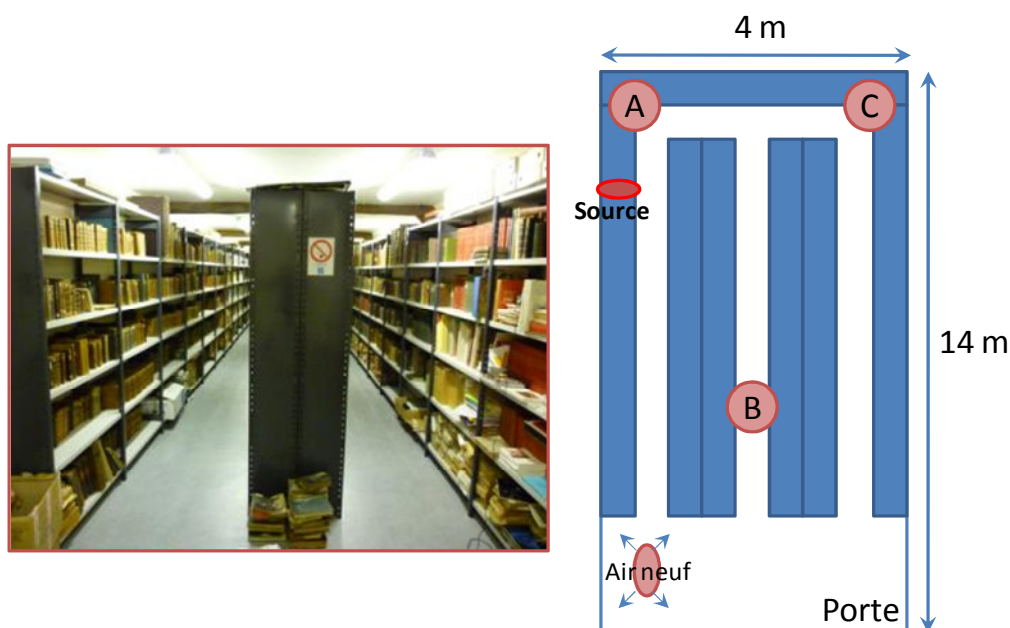


Figure III-6 : Photographie et Schéma des points de prélèvement à 1,5 m (A, B, C), au plafond (B, C) et au sol (C) dans la médiathèque de Château-Thierry

Tableau III-4 : Conditions de prélèvement dans le magasin de la Médiathèque de Château-Thierry et présence des COV du métabolisme (un signe + indique la présence du composé ; un signe – indique son absence)

N° de prélèvement	1	2	3	4	5	6	N° de prélèvement	1	2	3	4	5	6
Position	A	B	B	C	C	C	Position	A	B	B	C	C	C
Hauteur (m)	1,5	1,5	2,5	0	1,5	2,5	Hauteur (m)	1,5	1,5	2,5	0	1,5	2,5
1,3,6-heptadiène	-	-	-	-	-	-	3-méthyl-2-butanol	-	-	-	-	-	-
1,3-octadiène	+	+	+	+	+	+	3-méthyl-2-butanone	-	-	-	-	-	-
1,3-pentadiène	-	-	-	-	-	-	3-méthylfuran	+	+	+	+	+	+
1,4-heptadiène	-	-	-	-	-	-	3-pentanone	-	-	-	-	-	-
1-octen-3-ol	+	+	+	+	+	+	4-heptanone	+	+	+	+	+	+
1-octen-3-one	-	-	-	-	-	-	4-méthyl-1-heptène	-	-	-	-	-	-
2(5H)-furanone	-	-	-	-	-	-	4-méthyl-2-hexanone	-	-	-	-	-	-
2,5-diméthylfuran	-	-	-	-	-	-	Acid acetic, methyl ester	-	-	-	-	-	-
2-éthyl-2-hexenal	-	-	-	-	-	-	α-pinène	+	+	+	+	+	+
2-heptène	+	+	+	+	+	+	diméthylsulfide	+	+	+	+	+	+
2-méthyl-1-butanol	+	+	+	+	+	+	Ethyl-2-méthylbutanoate	-	-	-	-	-	-
2-méthylfuran	+	+	+	+	+	+	Ethyl-2-méthylpropanoate	-	-	-	-	-	-
2-pentanone	-	-	-	-	-	-	Méthoxybenzène	+	+	+	+	+	+
3-butyn-1-ol	-	-	-	-	-	-	Méthyl-2-éthyl-3-hydroxyhexanoate	-	-	-	-	-	-
3-heptanol	-	-	-	-	-	-	Méthyl-2-éthylhexanoate	-	-	-	-	-	-
3-hexanone	-	-	-	-	-	-	Méthyl-2-méthylbutanoate	-	-	-	-	-	-
3-méthyl-1-butanol	+	+	+	+	+	+	Terpinolène	+	+	+	+	+	+
							tetrahydro-2,2,5,5-tetraméthylfuran	-	-	-	-	-	-

L'analyse des composés volatils a montré que l'ensemble des traceurs fongiques présents dans cet environnement, a été retrouvé quel que soit le point de prélèvement.

Lors de la campagne de mesures effectuée à la **Bibliothèque privée du château d'Escorpain** (Figure III-7), deux salles séparées par un mur ajouré, ont été investiguées.



Figure III-7 : Photographies lors de la campagne de mesures effectuée à la bibliothèque privée du château d'Escorpain

Les points de prélèvement sont présentés Figure III-8. Deux prélèvements (A et B), situés respectivement au centre de la pièce et proche de la contamination, ont été réalisés dans la grande salle (16 x 4 m). Un prélèvement (C) a également été effectué dans la petite salle (4 x 6 m). Les trois prélèvements, d'une durée de 30 min, ont été réalisés simultanément et à 1 mètre de hauteur. Les traceurs détectés à chaque point de prélèvement sont présentés dans le Tableau III-5.

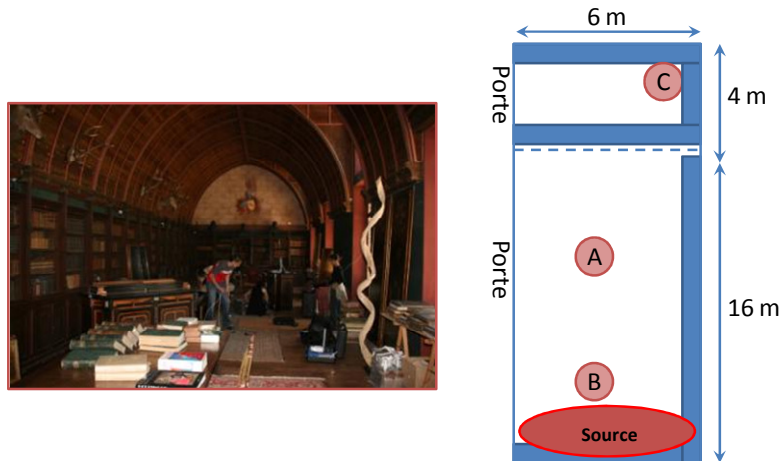


Figure III-8 : Photographie et Schéma des points de prélèvement à 1 m (A, B, C) dans la Bibliothèque privée du château d'Escorpain

Tableau III-5 : Présence des COV du métabolisme en fonction des points de prélèvement (un signe + indique la présence du composé ; un signe - indique son absence)

Position	A	B	C	Position	A	B	C
1,3,6-heptadiène	-	-	-	3-méthyl-2-butanol	+	+	+
1,3-octadiène	+	+	+	3-méthyl-2-butanone	+	+	+
1,3-pentadiène	+	+	+	3-méthylfurane	+	+	+
1,4-heptadiène	-	-	-	3-pentanone	-	-	-
1-octen-3-ol	+	+	+	4-heptanone	+	+	+
1-octen-3-one	+	+	+	4-méthyl-1-heptène	-	-	-
2(5H)-furanone	-	-	-	4-méthyl-2-hexanone	-	-	-
2,5-diméthylfurane	-	-	-	Acid acetic, methyl ester	-	-	-
2-éthyl-2-hexenal	-	-	-	a-pinène	+	+	+
2-heptène	+	+	+	diméthylsulfide	+	+	+
2-méthyl-1-butanol	+	+	+	Ethyl-2-méthylbutanoate	-	-	-
2-méthylfurane	+	+	+	Ethyl-2-méthylpropanoate	-	-	-
2-pentanone	-	-	-	Méthoxybenzène	+	+	+
3-butyn-1-ol	-	-	-	Méthyl-2-éthyl-3-hydroxyhexanoate	-	-	-
3-heptanol	-	-	-	Méthyl-2-éthylhexanoate	-	-	-
3-hexanone	-	-	-	Méthyl-2-méthylbutanoate	-	-	-
3-méthyl-1-butanol	+	+	+	Terpinolène	+	+	+
				tetrahydro-2,2,5,5-tetraméthylfurane	-	-	-



Comme dans le cas de la médiathèque de Château-Thierry, l'analyse des composés volatils a montré que l'ensemble des traceurs fongiques présents dans cet environnement, a été retrouvé quelque soit le point de prélèvement.

D'après ces résultats, la recherche de traceurs fongiques peut être réalisée à partir de prélèvements situés à distance d'une source de contamination, ou encore dans une zone de dilution d'air. Les mesures réalisées à différentes hauteurs n'ont pas mis en évidence de situations de prélèvement privilégiées vis-à-vis de la diffusion verticale des COV.

## II.2 VALIDATION DES INDICES

L'objectif de cette partie est d'éprouver sur sites les 3 indices de contamination fongique dans différents types d'environnements réels, à savoir 6 sites patrimoniaux : le musée du Louvre, le musée des arts décoratifs, le château de Champs-sur-Marne, le château de Fontainebleau, la bibliothèque privée du château d'Escorpain, la médiathèque de Château-Thierry et la grotte de Lascaux. L'ensemble de ces environnements a été investigué (inspection visuelle, prélèvement de surface et d'air) afin de déterminer leurs états de contamination : non contaminé, contamination active, ancienne contamination.

Suite à la stratégie d'échantillonnage définie précédemment, il semblerait qu'un unique prélèvement suffise pour le calcul des indices pour chaque salle investiguée.

### II.2.A Description des sites investigués

**Musée du Louvre (« Louvre »).** 3 salles.

Lors de la campagne de mesures effectuée au **musée du Louvre (« Louvre »)**, trois salles ont été investiguées (Figure III-9) : la salle des états (salle 1), la salle Percier et Fontaine (salle 2), et le salon carré adjacent à la salle 2 (salle 3). Aucune de ces salles ne présente de contamination fongique.

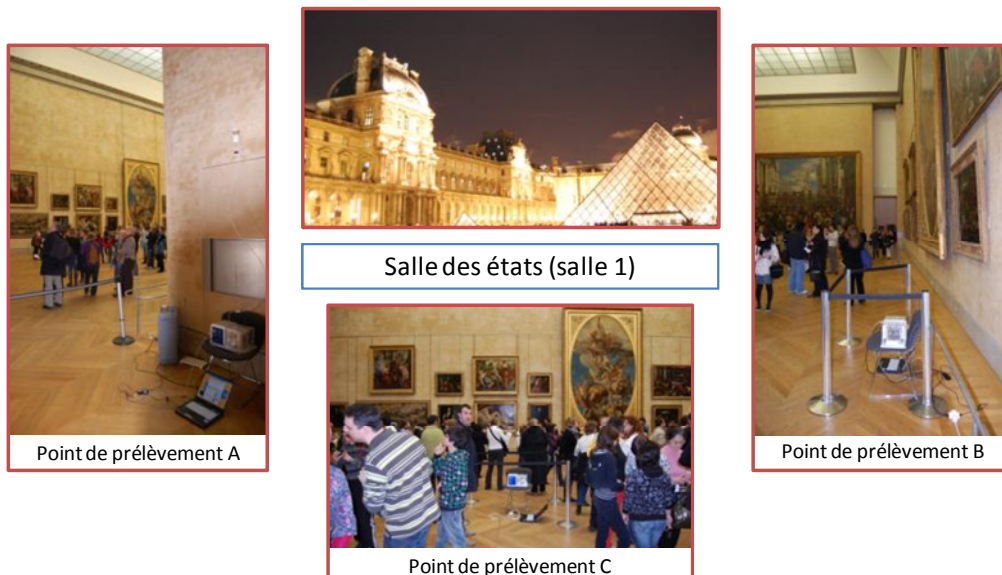


Figure III-9 : Photographies lors de la campagne de mesures effectuée au musée du Louvre

Cinq prélèvements COV ont été réalisés dans la salle des états (salle 1). Un plan de cette salle est présenté Figure III-10 et les conditions de prélèvement sont décrites dans le Tableau III-6.

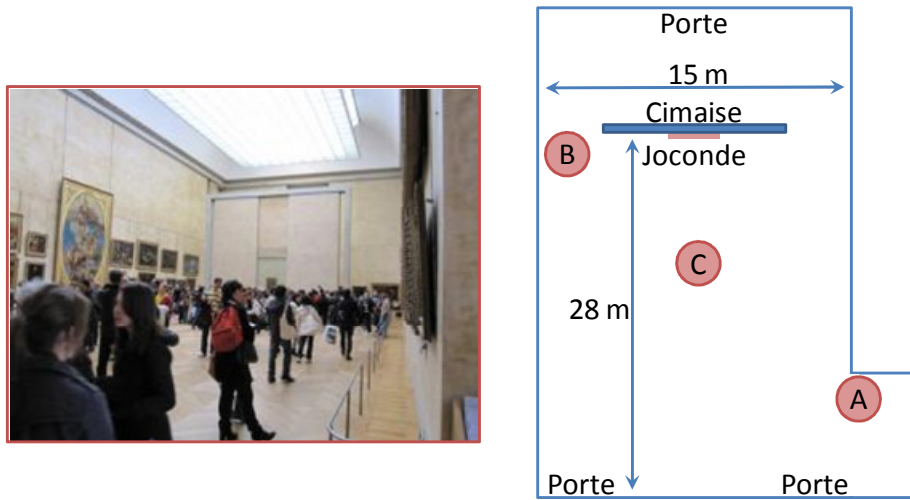


Figure III-10 : Photographie et Schéma des points de prélèvement (A, B, C) dans la salle des états du musée du Louvre (Paris)

Tableau III-6 : Conditions de prélèvement de la salle des états

N°	Position	Hauteur	Durée
1	A	1 m	30 min
2	A	2,5 m	30 min
3	B	1 m	30 min
4	C	1 m	30 min
5	C	1 m	60 min

Les prélèvements des salles 2 (A) et 3 (B) ont été réalisés à proximité d'un mur à 100 mL/min durant 30 min et à des hauteurs respectives de 1,3 m et 0,3 m. Un plan des salles est présenté Figure III-11.

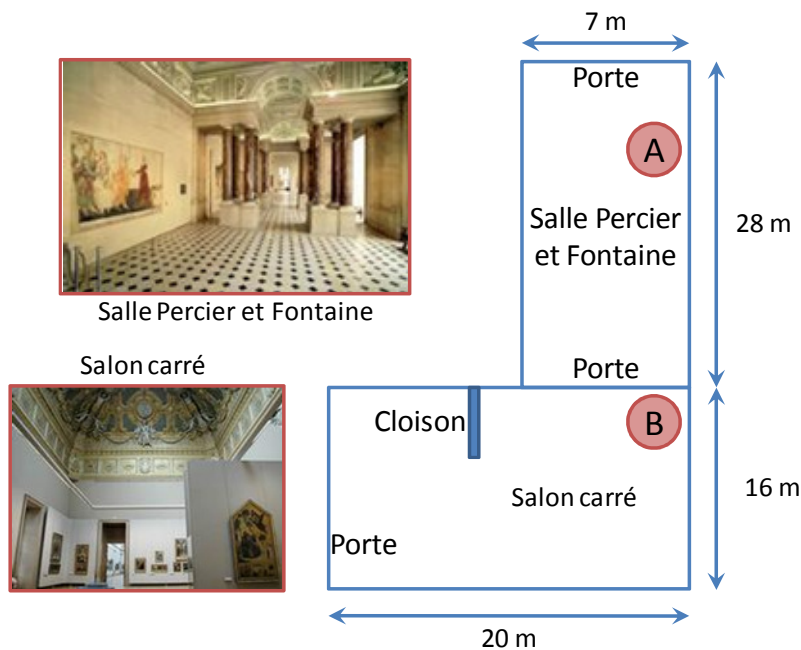


Figure III-11 : Photographie et Schéma des points de prélèvement à 1,3 m dans la salle Percier et fontaine et à 0,3 m dans le salon carré du musée du Louvre (Paris)



**Musée des arts décoratifs (« Art Déco »).** 5 salles.

- La Nef (salle 1 ; niveau 1) est une salle sans suspicion de contamination.
- La salle Maciet (salle 2 ; niveau 3), située dans le département « moyen âge ». Cette salle a fait l'objet d'une ancienne contamination visible par des moisissures au niveau des bouches de soufflage d'air froid de la climatisation. Cette contamination a été traitée et n'est plus visible actuellement.
- La galerie des sièges (salle 3 ; niveau 4), est une salle présentant une contamination sur des bouches de soufflage d'air froid situées derrière des coussins de sièges publics.
- La galerie des bijoux (salle 4 ; niveau 2) est une salle sans suspicion de contamination.
- La réserve « mode » (salle 5 ; niveau -3). Cette salle, sans accès au public, présente une odeur « d'humidité » et a servi de lieu de stockage d'albums de mode contaminés par des moisissures. Ces albums ont depuis été retirés.



*Figure III-12 : Photographies lors de la campagne de mesures effectuée au musée des arts décoratifs*

**Château de Champs-sur-Marne (« Champs »).** 3 salles.

Les salles investiguées sont celles décrites dans la partie II.1. « Stratégie d'échantillonnage ». Le salon chinois (salle 1) est le siège d'une ancienne contamination par un basidiomycète (mérule) conduisant à l'effondrement d'une partie des plafonds. Le salon rouge (salle 2) et le salon d'angle (salle 3) sont des salles respectivement à côté et au dessus de la salle 1.

**Château de Fontainebleau (« Fontainebleau »).** 6 salles.

- La bibliothèque (salle 1) présente une ancienne contamination par un basidiomycète. Cette contamination a été traitée et n'est plus active.
- La galerie François 1<sup>er</sup> (salle 2) est une salle sans suspicion de contamination. Cependant, une forte contamination par des basidiomycètes a été constatée dans la salle située au dessus de la galerie.
- La salle de bal (salle 3) est une salle présentant un dégât des eaux (présence de sels et salpêtre sur les murs) mais exempte de contamination fongique.
- La chapelle de la Trinité (salle 4) présente des contaminations par des moisissures.
- La galerie des assiettes (salle 5) présente une ancienne contamination par un basidiomycète (mérule). Cette contamination a été traitée et n'est plus active.
- La réserve de mobiliers (salle 6) est une salle sans suspicion de contamination.



Figure III-13 : Photographies lors de la campagne de mesures effectuée au château de Fontainebleau

**Bibliothèque privée du château d'Escorpain (« Escorpain »).** 1 salle.

Une contamination par des basidiomycètes (notamment la mэрule) sur les fenêtres de la bibliothèque a été constatée. Comme décrit dans la partie II.1. « Stratégie d'échantillonnage » cette pièce se compose de deux salles formant un ensemble de 20 mètres de long sur 6 mètres de largeur et contenant plus de 5 000 volumes. Une contamination par des deutéromycètes a été constatée sur des ouvrages d'un rayon de la bibliothèque. Cette contamination a été confirmée par des prélèvements de surface.

**Médiathèque de Château-Thierry (« Médiathèque »).** 1 salle.

Le magasin investigué est décrit dans la partie II.1. « Stratégie d'échantillonnage ». Cette pièce est le siège d'une contamination par des moisissures située au niveau de reliures en cuir de livres anciens. La contamination est visible et confirmée par une mise en culture de prélèvements de surface.

**Grotte de Lascaux (« Lascaux »).** 2 prélèvements.

La grotte de Lascaux présente une contamination par un deutéromycète (*Fusarium solani*). Suite à cette constatation, des travaux de décontamination ont été effectués. Deux prélèvements ont ainsi été réalisés avant et après traitement de la contamination.



Copyright : LRMH/Dominique Bouchardon/2004

*Figure III-14 : Photographies lors de la campagne de mesures effectuée à la grotte de Lascaux*

Pour l'ensemble des sites investigués, chacune des salles est répertoriée suivant trois états de contamination permettant la validation des trois indices élaborés : cas d'un environnement non contaminé, cas d'un environnement contaminé et enfin cas d'environnement anciennement contaminé.

Les états de contaminations pour chaque salle des différents sites sont synthétisés dans le Tableau III-7.

Tableau III-7 : Synthèse des états de contamination selon la salle et le site investigué.

Site	Salle	Environnement non contaminé	Environnement contaminé (type de contamination)	Environnement anciennement contaminé (type de contamination)
Musée du Louvre	Salle des états (salle 1)	X		
	Salle Percier et Fontaine (salle 2)	X		
	Salon carré (salle 3)	X		
Musée des arts décoratifs	Nef (salle 1)	X		
	Salle Maciet (salle 2)			X (Deutéromycètes)
	Galerias des sièges (salle 3)		X (Deutéromycètes)	
	Galerias des bijoux (salle 4)	X		
	Réserve "mode" (salle 5)			X (Deutéromycètes)
Château de Champs-sur-Marne	Salon chinois (salle 1)			X (Basidiomycètes)
	Salon rouge (salle 2)			X (Basidiomycètes)
	Salon d'angle (salle 3)			X (Basidiomycètes)
Château de Fontainebleau	Bibliothèque (salle 1)			X (Basidiomycètes)
	Galerie François 1 <sup>er</sup> (salle 2)		X (Basidiomycètes)	
	Salle de bal (salle 3)	X		
	Chapelle de la Trinité (salle 4)		X (Deutéromycètes)	
	Galerie des assiettes (salle 5)			X (Basidiomycètes)
	Réserve de mobiliers (salle 6)	X		
Château d'Escorpain			X (Deutéromycètes et Basidiomycètes)	
Médiathèque de Château-Thierry			X (Deutéromycètes)	
Grotte de Lascaux				X ( <i>F. solani</i> )

## II.2.B Application des indices pour des environnements non contaminés

Dans la suite de l'étude, l'indice de contamination fongique dédié aux environnements intérieurs sera dénommé « ICF », celui dédié à la contamination par *F. solani* des grottes de Lascaux « Lascaux », et l'indice dédié à la détection de basidiomycètes sur le bois « Phellinus ».

Pour les 3 indices, une valeur positive (+) indique la présence d'un développement fongique dans la salle investiguée, alors qu'une valeur négative (-) l'exclut.

Les différents indices ont été calculés dans 6 salles non contaminées de différents sites afin de vérifier l'absence de faux-positifs. Les résultats obtenus sont synthétisés dans le Tableau III-8.

Tableau III-8 : Réponse des indices pour des environnements non contaminés

Lieu - Salle	Réponse des indices		
	ICF	Lascaux	Phellinus
Louvre - Salle 1	-	-	-
Louvre - Salle 2	-	-	-
Louvre - Salle 3	-	-	-
Art déco - Salle 1	-	-	-
Art déco - Salle 4	-	-	-
Fontainebleau - salle 3	-	-	-
Fontainebleau - salle 6	-	-	-

Pour l'ensemble des salles, les différents indices confirment l'absence de contamination par les micromycètes. Le bruit de fond engendré par ces différents types d'environnements n'a donc pas interféré dans le calcul des différents indices.

### II.2.C Application des indices pour des environnements contaminés

Les indices ont été calculés dans 6 salles de différents sites présentant des signes de contaminations par des deutéromycètes et/ou des basidiomycètes. Les résultats obtenus sont synthétisés dans le Tableau III-9.

Tableau III-9 : Réponse des indices pour des environnements contaminés

Lieu - Salle	Indice ICF	Nb de Cibles		Indices	
		Lin	Colle	Lascaux	Phellinus
Art déco - Salle 3	+	1/6	0/1	-	-
Fontainebleau - salle 2	-	0/6	0/6	-	+
Fontainebleau - salle 4	+	1/6	0/1	-	-
Escorpain	+	2/6	0/1	-	+
Médiathèque	+	0/6	0/1	-	-

Dans le Musée des arts décoratifs, la salle 3 (galerie des sièges), présente une contamination active de moisissures. Cette contamination est confirmée par l'indice « ICF ».

La contamination sur un tissu dans cette salle est accompagnée de la présence d'une « cible lin ». En revanche, l'éventuelle contamination sur tissu dans la salle 4 de Fontainebleau et à Escorpain (présence de « cible lin ») n'a pas pu être confirmée par l'inspection visuelle de ces salles.

Les autres cas de contaminations par des deutéromycètes sont également confirmés par l'indice « ICF ». Les contaminations par les basidiomycètes ont été détectées par l'indice « Phellinus ». Ce même indice reste négatif en l'absence de contamination par des basidiomycètes, malgré la présence de deutéromycètes. L'indice « Lascaux » reste négatif dans tous les cas.

## II.2.D Application des indices pour des environnements anciennement contaminés

Les différents indices ont été calculés dans 7 salles de différents sites présentant des anciennes contaminations par des micromycètes. Les résultats obtenus sont synthétisés dans le Tableau III-10.

Tableau III-10 : Réponse des indices pour des environnements anciennement contaminés

Lieu - Salle	Indice ICF	Indices	
		Lascaux	Phellinus
Art déco - Salle 2	-	-	-
Art déco - Salle 5	-	-	-
Champs - salle 1	-	-	-
Champs - salle 2	-	-	-
Champs - salle 3	-	-	-
Fontainebleau - salle 1	-	-	-
Fontainebleau - salle 5	-	-	-

Pour toutes les salles présentant des anciennes contaminations, le calcul des différents indices donne un résultat négatif.

La salle n°2 (Maciet) du musée des arts décoratifs, qui a fait l'objet d'une contamination visible de moisissure au niveau des bouches de soufflage d'air froid de la climatisation, ne présente plus de signe de développement fongique actif. Cette observation montre l'efficacité du nettoyage qui avait été entrepris. De la même façon, bien qu'ayant servi de lieu de stockage d'albums de mode contaminés, la salle n°5 (réserve « mode ») ne présente pas de signe de développement fongique actif. Cela permet de vérifier que les COV spécifiques d'une contamination fongique ne sont plus détectables lorsque la source n'est plus présente.

Le château de Champs-sur-Marne, ainsi que les salles 1 et 5 du château de Fontainebleau, ont fait l'objet d'une contamination par un basidiomycète. Après décontamination des salles, le calcul des indices, notamment celui de l'indice « Phellinus », montre que les différentes salles ne présentent plus de signes de contamination active.

Les différents indices ont également été éprouvés lors de prélèvements réalisés sur le site de Lascaux. La grotte ayant fait l'objet d'une contamination par un deutéromycète (*Fusarium solani*), des prélèvements ont pu être effectués avant et après traitement de la contamination. Les résultats du calcul des indices sont synthétisés dans le Tableau III-11.

Tableau III-11 : Réponse des indices sur le site de Lascaux avant et après traitement d'une contamination par *Fusarium solani*

Salle	Indice ICF	Nb de Cibles		Indices	
		Lin	Colle	Lascaux	Phellinus
Lascaux - avant traitement	-	0/6	0/6	+	-
Lascaux - après traitement	-	0/6	0/6	-	-

Seul l'indice développé spécifiquement pour ce cas de contamination montre une réponse positive lors du prélèvement réalisé avant traitement et une réponse négative pour celui réalisé après traitement. En effet, l'indice était alors de 2 (> 0 ; Présence de 2-méthylfurane, 3-méthylfurane, 1-octèn-3-ol, 1,3-octadiène, 2-pentenal et 3-hexanone) avant traitement et -6 (< 0 ; absence de traceurs) après traitement. Les autres indices restent négatifs pour les deux prélèvements.



### III DISCUSSION

Dans l'ensemble des environnements investigués, toutes les contaminations fongiques ont pu être mises en évidence par l'utilisation de 3 indices (1 indice environnement intérieur et 2 indices spécifiques). L'emploi de ces différents indices permet ainsi de décrire plus spécifiquement des cas de contamination fongique située sur du lin, de la colle de restauration (à base de peau de lapin), ou encore dans le cas de contaminations par *Fusarium solani* colonisant la grotte de Lascaux, ou par *Phellinus megaloporus* sur du bois.

Dans les différents indices, plusieurs traceurs sont spécifiques des supports contaminés, résultats en accord avec la littérature. En effet, la dépendance de certaines de ces molécules vis-à-vis du matériau colonisé a été constatée par Wilkins et Larsen, 1995; Sunesson *et al.*, 1996; Korpi *et al.*, 1998; Moularat *et al.*, 2008b. Par ailleurs, d'après Wilkins (2002), les composés organiques spécifiques d'un développement fongique sont des molécules dont la chaîne carbonée varie de C2 à C20.

L'adsorbant solide utilisé (TENAX TA) limite le prélèvement à des composés organiques volatils présentant un point d'ébullition supérieur à 60°C, ce qui d'un point de vue pratique a limité notre champ d'investigation aux composés de C4 à C20. Les composés très volatils et inorganiques ne sont ainsi pas retenus par cet adsorbant. Par conséquent l'adsorbant utilisé permet le piégeage de la plupart des composés issus d'un développement fongique. De plus, la même étude montre que les molécules des groupes C2 à C4 émises par les moisissures sont également produites par de nombreux organismes vivants. Du fait de leur manque de spécificité, ces molécules n'ont pas été retenues dans le cadre de notre étude.

La validation *in situ* des différents indices a permis d'éprouver leurs applications à ces types d'environnements (Châteaux, musées, bibliothèques, grottes ornées...) en détectant l'ensemble des cas de contaminations. Ces essais montrent que le développement d'un indice est envisageable pour des cas de contamination fongique spécifique.

Une contamination sur du tissu a notamment pu être mise en évidence dans un musée par la détection d'une des cibles spécifiques du lin. Cependant, la recherche de cibles spécifiques du support reste à approfondir. En effet, pour d'autres cas de contamination fongique avérés, la présence d'une autre contamination suspectée sur le lin par la présence de cible spécifique, n'a pas pu être confirmée. D'un point de vue pratique, cette description permettrait de faciliter la localisation d'une source de contamination en incriminant un type de matériau contaminé.

Outre la détection de contamination, des essais ont été réalisés afin de vérifier l'application des indices au contrôle de la remédiation d'environnements anciennement contaminés. Ainsi, l'absence de traceurs fongiques suite à l'arrêt d'un développement fongique a été vérifiée. En effet, les traceurs sélectionnés lors du développement des indices de contamination étant issus du métabolisme fongique (Moularat *et al.*, 2008c), l'absence de développement fongique implique l'arrêt de leurs émissions. Les essais *in situ* réalisés dans ce travail de thèse ont montré l'absence de la persistance des traceurs dans un environnement. De plus, les traitements chimiques mis-en-œuvre pour éliminer une contamination (château de Champs-sur-Marne, Grotte de Lascaux) n'ont pas interféré dans le calcul de l'indice. Par conséquent, l'utilisation d'indices de contamination est également une solution pertinente pour le contrôle de la remédiation.

L'utilisation de ces indices permet par ailleurs de mettre en place une procédure de surveillance de contamination puisqu'il a été démontré que ces traceurs sont détectables dès le deuxième jour de développement fongique (Wessen *et al.*, 1995; Korpi *et al.*, 1999; Wilkins, 2002; Moularat *et al.*, 2008c). De plus, la diffusion des COV à travers les parois poreuses permet de détecter des contaminations cachées et ainsi de traiter les surfaces avant qu'une

dégradation avancée ne soit constatée (Korpi *et al.*, 1998). Cette diffusion a également été vérifiée lors de ce travail de thèse (château de Champs-sur-Marne, musée du Louvre).

Les essais réalisés dans de grands volumes (musée du Louvre, château de Champs-sur-Marne, médiathèque...) ont mis en évidence la diffusion des COV avec une homogénéité, d'un point de vue qualitatif, dans l'ensemble d'un volume. Cette homogénéité a été vérifiée pour les traceurs fongiques dans la médiathèque contaminée. Ainsi, un unique point de prélèvement par salle est nécessaire pour détecter, par les COV, une contamination fongique dans un environnement clos.

Cette première partie de l'étude met en évidence l'utilité d'utiliser différents indices et/ou cibles afin à la fois de décrire au mieux un cas de contamination, et pouvoir s'adapter à des environnements spécifiques. La possibilité de développer des traceurs spécifiques pour différents couples support de croissance / espèce fongique implique la recherche de différentes cibles chimiques dont la liste s'adapte aux environnements investigués. Aussi, le système de détection à mettre en œuvre doit permettre, notamment par un paramétrage simple *in situ*, une modularité et une sélectivité vis-à-vis des COV présents.





**DEUXIEME PARTIE :**  
**CONCEPTION D'UN MICROSYSTEME DEDIE**  
**A L'ANALYSE DE COV CIBLES**



## CHAPITRE I : ETAT DE L'ART

De nombreuses méthodes d'analyses ont été développées pour détecter ou évaluer certains constituants de l'air présents dans les environnements intérieurs et potentiellement liés à différents types de risques (sanitaire, incendie...).

L'évaluation des incidences sur l'environnement des polluants organiques requiert des outils analytiques fiables permettant de les examiner rapidement. La littérature montre un intérêt croissant pour l'utilisation des capteurs chimiques pour la surveillance de l'environnement et les récentes avancées technologiques (automatisation des procédés, méthodes de microfabrication...) vont certainement permettre de faciliter le développement des applications de ces capteurs.

### I LES CAPTEURS : PRINCIPES GENERAUX ET DEFINITION

La plupart des capteurs de gaz destinés à la surveillance des conditions environnementales ont été développés depuis les années 1960. Le premier de ces capteurs fut conçu et rapporté par Seiyama *et al.* en 1962 avec un **capteur de gaz résistif** utilisant un oxyde semi-conducteur pour la détection de gaz inflammables (Seiyama *et al.*, 1962). Les capteurs de **gaz semi-conducteurs** vont être les sujets de plusieurs études, en particulier sur l'amélioration la sensibilité pour la détection de gaz inflammables ou toxiques (ajout de métaux nobles tels que le palladium) avant d'être commercialisés dans les années 1970 (Harsanyi, 1995b; Yamazoe et Shimano, 2007; Wilson et Baietto, 2009).

Ces recherches ont alors suggéré le développement de capteurs pour d'autres domaines tels que la santé, l'énergie, l'environnement, l'agroalimentaire, l'agriculture... Les technologies de capteurs de gaz ont alors connu une forte expansion dans les années 1980. De nombreux capteurs de gaz ont été développés, en particulier, grâce à des innovations de chercheurs japonais. Les recherches, dans le domaine des capteurs de qualité de l'air qui nous intéresse, ont principalement porté sur la mesure de la concentration de CO<sub>2</sub>, les fumées de cigarettes, etc... Dans les années 90, les capteurs de gaz ont connu des améliorations de sensibilité permettant d'envisager leurs emplois pour la mesure de polluants atmosphériques.

#### I.1 DEFINITION ET PERFORMANCES

La littérature propose de nombreuses définitions d'un capteur dont celle de W.Göpel :  
« *Un capteur est défini comme un composant qui convertit une propriété physique ou chimique définie en un signal électrique* » (Göpel et Schierbaum, 1991a).

Un capteur de gaz se compose généralement de deux éléments:

- **L'élément sensible** réagissant en présence de l'espèce gazeuse à détecter,
- **Le transducteur** convertissant en un signal mesurable électrique la réaction entre l'élément sensible et le gaz.

Afin de pouvoir évaluer la qualité des différentes méthodes d'analyses et les capteurs associés, il existe de nombreux critères sous forme de performances métrologiques (Göpel et Schierbaum, 1991a; Mazet, 2004; Ngo, 2006; Kaur *et al.*, 2007; Lochon, 2007) dont la littérature propose de nombreuses définitions:

La **sensibilité** exprime la variation de la grandeur physique de sortie ( $\Delta X$ ) en fonction de la variation de la concentration du gaz ( $\Delta C_{gaz}$ ):

$$S = \frac{\Delta X}{\Delta C_{gaz}}$$

La **sélectivité** caractérise la faculté d'un capteur à isoler l'action d'une seule espèce gazeuse dans un mélange y compris face à d'autres interférents. Les méthodes physico-chimiques utilisées dans la majorité des microcapteurs n'ont généralement qu'une sélectivité catégorielle ou partielle (détection d'un gaz de façon préférentielle à un autre mais qui présentera toujours une réponse plus ou moins importante).

La **stabilité** est définie par rapport à la dérive du signal dans le temps. Elle conditionne le traitement de l'information en limitant notamment l'étalonnage des dispositifs de mesures. Si le signal évolue spontanément dans le temps, donc de façon incontrôlée, on parle de dérive.

La **répétabilité** est caractérisée par l'écart des résultats obtenus sur des mesures répétées d'un même environnement gazeux dans des conditions identiques. La **reproductibilité** correspond à la répétabilité mais sur des échelles de temps et de lieux différents

La **réversibilité** est la faculté du capteur à revenir à son état initial dès que cesse l'action du gaz. Ce paramètre, caractérisant principalement les propriétés de réversibilité des réactions physico-chimiques sur le matériau sensible, influence directement la reproductibilité.

L'**hystérésis** se caractérise par la persistance de l'effet lorsque la cause s'est arrêtée. Ce phénomène implique qu'il n'y a pas superposition entre les courbes d'évolution croissante, d'une part, et décroissante, d'autre part, de la grandeur physique de sortie en fonction de la variation de concentration.

La **résolution** est définie comme la plus petite variation de concentration en gaz qui produit un signal de sortie exploitable. Ce paramètre est fortement lié à la sensibilité mais aussi au bruit : plus la résolution est fine, plus le capteur peut détecter de faibles variations de concentration en gaz. De façon similaire, la **limite de détection** est définie comme la plus petite valeur de concentration décelable. Sous cette limite, la valeur ne peut pas être dissociée du bruit de fond.

L'**étendue de mesure** est définie comme la gamme de valeur de la grandeur à mesurer pour laquelle le capteur produit un signal exploitable.

Le **temps de réponse** est généralement défini comme étant le temps nécessaire pour atteindre 90 % de sa variation finale stabilisée, lors de l'exposition du capteur à une concentration fixe d'une espèce gazeuse. Il permet d'apprécier son aptitude à suivre les variations de la grandeur captée en entrée. La définition du **temps de recouvrement** est analogue à celle du temps de réponse, mais elle concerne le retour du capteur à son état initial.

D'autres paramètres tels que la **température de fonctionnement**, la **puissance électrique consommée**, l'**encombrement** et le **coût** permettent également de caractériser un capteur. Cependant, la puissance électrique consommée, l'encombrement et le coût avec les technologies dérivées de la micro-électronique – les micro / nano-technologies constituent des paramètres plus facilement maîtrisables.

Avant de poursuivre notre exposé, il y a lieu **de traduire le problème de la détection fongique traité dans cette thèse, en termes de problème métrologique**. Afin de réaliser notre objectif, nous devons être capables, à partir d'un même échantillon d'air:

- de détecter la présence des COV d'intérêt : c'est une question de **sensibilité**,
- de déceler d'infimes quantités de ces COV, souvent en concentrations extrêmement faibles : c'est une question de **limite de détection**,
- de reconnaître et discerner les différents COV en présence, la variété de COV pouvant être de l'ordre de la dizaine, au sein du même échantillon : c'est à la fois une question de sélectivité mais aussi de **reconnaissance multiple**.

A travers de ces critères de performances, on voit qu'un capteur seul ne pourra pas répondre à l'ensemble de ces contraintes métrologiques. On doit ainsi **évoluer du (micro)capteur simple vers un (micro)système d'analyse**, dans lequel pourront être traitées notamment les questions de sélectivité et de reconnaissance multiple. Nous verrons par la suite que la technique de **séparation chromatographique** est adaptée à ce problème. En ce qui concerne la question de limite de détection, elle sera traitée par une technique dite de **préconcentration**, qui, comme son nom l'indique, consiste à produire (localement) une concentration plus élevée que celle de l'échantillon prélevé.

Dans de tels systèmes chromatographiques, dédiés à l'analyse sélective d'un grand ensemble de composés gazeux, le problème du capteur reste tout entier. Après les opérations de préconcentration et de séparation, l'ensemble des composés gazeux doivent être détectés (de façon séquentielle) et faire l'objet, le cas échéant, d'une mesure quantitative.

Traditionnellement, les analyses de gaz quantitatives et qualitatives sont réalisées en utilisant les techniques d'analyses telles que la chromatographie en phase gazeuse ou liquide couplée à un spectromètre de masse, qui sont des instruments de laboratoire, très coûteux et volumineux.

Un échantillon est collecté et rapporté au laboratoire où il subira de longues étapes de séparation ou de préconcentration. Malgré le fait qu'elles soient hautement sensibles et fiables, ces techniques posent des problèmes de miniaturisation et ne sont pas disposées à permettre une surveillance en temps réel des polluants présent dans l'air (Pejcic *et al.*, 2007).

La section qui suit traite des principaux (micro)capteurs dédiés à la mesure des composés gazeux.

## I.2 DESCRIPTION DES PRINCIPAUX CAPTEURS DE GAZ

Actuellement l'industrie et la recherche s'orientent vers des méthodes plus légères et moins coûteuses, avec l'apparition sur le marché de microcapteurs, généralement moins performants mais plus pratiques. Avec le développement de l'électronique et notamment des micro / nano-technologies, des recherches et publications montrent un intérêt pour le développement de systèmes à base de capteurs pour compléter ou remplacer les méthodes d'analyses existantes. La littérature classe selon leurs méthodes de transduction, les capteurs de gaz en trois principales familles : les capteurs électrochimiques, résonnants et optiques (Kaur *et al.*, 2007; Pejcic *et al.*, 2007).

Tableau I-1 : Familles de capteurs et principes de transduction

Famille de capteurs	Principe de transduction	Principaux types de capteurs
Electrochimiques	Mesure des variations d'un signal électrique généré entre les bornes de deux électrodes	Capteurs à effet de champs polymères conducteurs oxydes métalliques
Résonnants	Mesure des variations de fréquence ou de propagation des ondes sur un matériau en résonance	Microbalance à cristal de quartz Ondes acoustiques de surfaces Micropoutres
Optiques	Mesure des variations de couleurs ou d'une émission lumineuse	colorimétriques fluorescence UV Fibre optique

### I.2.A Capteurs électrochimiques

La méthode de transduction utilisée se base sur la mesure d'un signal électrique généré entre les bornes de deux électrodes, par une réaction d'oxydoréduction de l'espèce à détecter. Les plus utilisés dans les matrices pour l'analyse des gaz sont les **oxydes métalliques**, les **polymères conducteurs** et dans une moindre mesure, les **transistors à effet de champ** (Zdanevitch, 2000).

**Les oxydes métalliques** se basent sur une couche d'oxyde semi-conducteur homogène déposée sur un substrat entre deux électrodes mesurant la conductance et comportant un filament électrique chauffant (Göpel et Schierbaum, 1991b; Ramalho, 1999).

Les propriétés conductrices de la couche sensible sont modifiées en présence de gaz oxydant ou réducteur. L'adsorption d'un gaz réducteur, donneur d'électrons, conduit à une augmentation de la conductivité du capteur (donc une baisse de la résistivité). Un gaz oxydant (comme l'oxygène) attirera les électrons du semi-conducteur entraînant une augmentation de la résistance du capteur (Zdanevitch, 2000). Une tension de chauffage est nécessaire afin d'accélérer les réactions se produisant à la surface et éventuellement de désorber les composés résiduels, de sorte de minimiser les effets d'hystérésis.

Les matériaux semi-conducteurs les plus couramment utilisés dans ces dispositifs sont des oxydes de métaux lourds à partir d'étain et de métaux de transition avec un dopage type N. Le dopage consiste à augmenter la densité en électrons (type N) ou en trous (type P) d'un matériau semi-conducteur intrinsèque (matériau non dopé) en introduisant dans sa structure des atomes d'un autre matériau. Le film le plus fréquemment employé est le SnO<sub>2</sub> (premier brevet japonais en 1962), constitué d'une couche d'oxyde semi-conducteur dopée par des éléments métalliques (Pt, Pd, Al, In...). Appliqués à la détection d'espèces gazeuses, d'autres films d'oxydes semi-conducteurs de type N ont été développés tels que TiO<sub>2</sub>, ZnO ou de type P tels que Ag<sub>2</sub>O, MnO<sub>2</sub>, NiO (Göpel *et al.*, 1992).

En fonction de leurs procédés de fabrication, les capteurs à base d'oxydes métalliques sont regroupés en deux catégories, les capteurs à couche épaisse et à couches minces:

- Les capteurs à couche épaisse sont produits par déposition d'une couche d'oxyde d'étain dans un tube céramique au milieu duquel passe le fil chauffant. La sélectivité et la durée de vie de ce type de capteurs sont déterminées par un nombre de facteurs incluant la température d'opération, l'épaisseur de l'oxyde d'étain et le choix des matériaux dopants (Kohl, 1997, 2001).

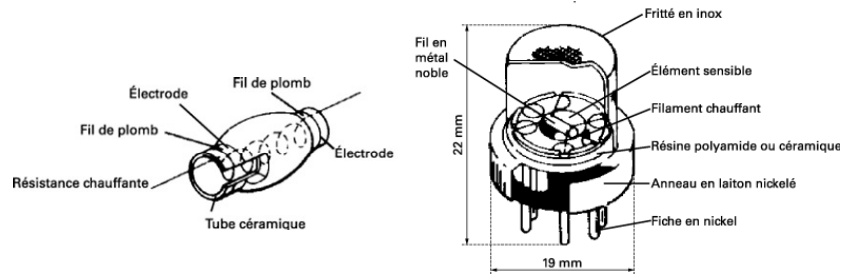


Figure I-1 : Capteur à couche épaisse à base de poudre de  $\text{SnO}_2$  frittée (<http://www.figarosensor.com>)

- Le procédé de fabrication des capteurs à couche mince nécessite le dépôt d'une couche de  $\text{SiO}_2$  électriquement isolée sur une tranche de silicium de type n, par oxydation sèche (Corcoran *et al.*, 1993). Les tranches de silicium sont traitées par photolithographie pour définir la forme de métallisation désirée. Le film d'oxyde d'étain est pulvérisé sur la surface du substrat de silicium ( $\text{SiO}_2$ ). La métallisation du système est exécutée par sublimation à vide.

Les capteurs à couche mince présentent de nombreux avantages comparés aux capteurs à couche épaisse : petite taille, faible consommation, amélioration de la reproductibilité et du temps de réponse (Kohl, 1997).

De nombreuses applications ont utilisé ce type de capteur pour la discrimination de composés purs, l'identification de composés cibles dans les mélanges et la caractérisation d'échantillons complexes.

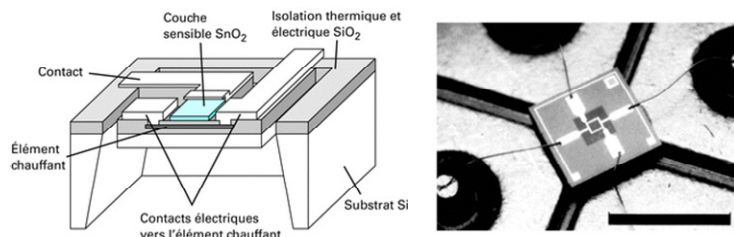


Figure I-2 : Schéma de principe et photographie d'un capteur oxyde métallique à couche mince (<http://www.microsens.ch>)

**Les polymères conducteurs** ont été utilisés en tant que couche active des capteurs de gaz depuis le début des années 80. En effet, lors de leurs travaux sur le polyacétylène en 1977, Shirakawa *et al.* ont mis en évidence une augmentation de conductivité d'un facteur  $10^7$  lors de l'exposition à des vapeurs d'iode ou de brome (Shirakawa *et al.*, 1977). Le principe de fonctionnement de ces capteurs est basé sur la variation de conductivité du polymère, de manière réversible, induite par l'adsorption de composés gazeux à sa surface. Cette adsorption dépend de l'affinité du composé avec le site actif présent dans le polymère (Teasdale et Wallace, 1993; Lange *et al.*, 2008). Les polymères les plus étudiés et utilisés dans ces applications en raison de leur stabilité à l'air, sont des dérivés du polypyrrole, du polythiophène et de la polyaniline (Skotheim et Reynolds, 1998; Kaur *et al.*, 2007). La variété des monomères et les multiples possibilités de substitutions permettent une grande diversification des capteurs utilisables (Bartlett et Gardner, 1992; Bai et Shi, 2007).

Les polymères conducteurs peuvent être regroupés en deux classes de matériaux :

- Les *polymères conducteurs extrinsèques*, sont obtenus par ajout de charges conductrices à une « matrice polymère » isolante. Ces charges sont des matériaux



comme le noir de carbone (carbon-black) ou des métaux finement morcelés (Bouvree *et al.*, 2009).

- Les *polymères conducteurs intrinsèques*, dont le squelette est un enchaînement de liaisons conjuguées, naturellement conducteurs d'électrons. A l'état neutre (non chargé), ils ne sont pas conducteurs ( $\sigma < 10^{-5} \text{ S.cm}^{-1}$ ). Leur conductivité intrinsèque résulte de la formation de porteurs de charge, en oxydant (dopage P) ou en réduisant (dopage N) la chaîne conjuguée. Cette conductivité ne s'obtient donc de façon significative qu'avec un procédé de dopage ( $\sigma \sim 1-10^5 \text{ S.cm}^{-1}$ ). Les polymères conducteurs peuvent être dopés par des réactions d'oxydoréduction ou de protonations. Ce dernier mode de dopage n'est applicable que pour la polyaniline (Bai et Shi, 2007).

Les polymères conducteurs peuvent être synthétisés par polymérisation chimique ou électrochimique des monomères :

La *polymérisation chimique* consiste à mélanger un monomère et un oxydant dans un solvant. Les oxydants les plus couramment utilisés sont le persulfate d'ammonium, le chlorure ferrique, le peroxyde d'hydrogène, le dichromate de potassium et le sulfate de cérium (Bai et Shi, 2007). Le polymère peut alors être retrouvé sous deux formes, soluble ou insoluble. La forme soluble (solution de polymère) peut être déposée directement sur un substrat par différentes techniques telles que le dip-coating (McGovern *et al.*, 2005), le spin-coating (Tongpool et Yoriya, 2005), la technique de Langmuir-Blodgett (Sagisaka *et al.*, 1993), ou encore le drop-coating (Arshak *et al.*, 2007). La forme insoluble (poudre) pourra être compressée afin d'obtenir des pastilles de polymère qui seront collées entre deux électrodes à l'aide d'un verni conducteur (Schottland, 1998).

De nombreux polymères tels que le poly(phénylène vinylène), le poly(phénylène éthylène) et leurs dérivés sont couramment réalisés via d'autres voies de synthèses chimiques telles que des réactions de Wittig ou de Heck. En effet, leurs chaînes sont constituées de double ou triple liaisons C-C en plus de leurs noyaux aromatiques. Les polythiophènes et leurs dérivés peuvent être polymérisés grâce à des réactions de couplage (Aubert *et al.*, 2006). Ces synthèses chimiques permettent d'obtenir des polymères conducteurs régioréguliers ou des copolymères bien définis.

La *polymérisation électrochimique* peut être réalisée par des méthodes galvanostatiques, potentiostatiques, de voltamétrie cyclique ou d'autres méthodes potentiodynamiques. Pour toutes ces techniques, un montage à trois électrodes est généralement utilisé. Ce montage se compose d'une électrode de travail, d'une contre électrode et d'une électrode de référence. Ces électrodes sont plongées dans une solution électrolytique de monomère. Des réactions en chaîne permettent d'obtenir un polymère insoluble qui précipite sur l'électrode de travail sous la forme d'une couche mince. Dans le cas des capteurs, deux électrodes constituent l'électrode de travail entre lesquelles le polymère croît. Cette méthode permet de synthétiser un polymère par l'oxydation anodique du monomère présent dans la solution d'électrolytes. Celle-ci conduit à la formation d'un radical cationique qui va initier le début de croissance d'un film polymère jusqu'à aboutir à la forme oxydée, conductrice souhaitée, à savoir, des chaînes de monomères polycationiques équilibrées par des contre-ions provenant de la solution d'électrolytes (Persaud et Pelosi, 1992). Les différents contre-ions tels que  $\text{ClO}_4^-$ ,  $\text{BF}_4^-$ ,  $\text{PF}_6^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{CF}_3\text{SO}_3^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{AsF}_6^-$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  sont utilisés selon le polymère conducteur considéré. Le niveau de dopage optimum dépend de la structure du polymère, du potentiel électrique appliqué, du solvant utilisé et de la nature des électrolytes (Heinze et Dietrich, 1989; Hamilton *et al.*, 2005).

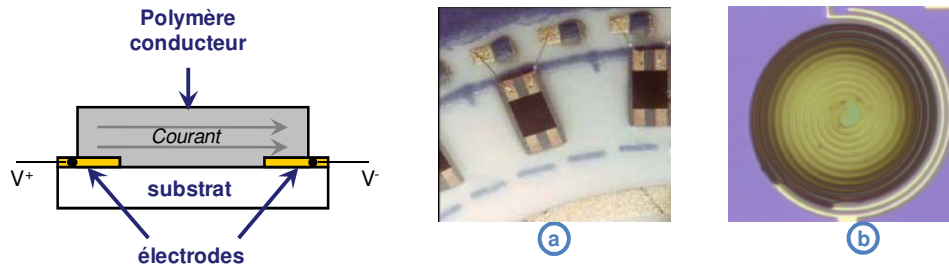


Figure I-3 : Schéma de principe d'un capteur à polymère conducteur et photographie de capteurs polymères conducteurs sur électrode simple (source ctib-tchn) (a) et sur électrodes interdigitées spirales (Li et al., 2007a) (b)

**Les capteurs chimiques à effet de champ** sont basés sur une structure dérivée des transistors « Metal Oxide Semiconductor Field Effect Transistor » (MOSFET). Ils conservent la structure du transistor en remplaçant la couche usuelle de la grille par une couche conductrice (métal, semi-conducteur, polymère ou électrolyte) qui présente une affinité avec les gaz (Harsanyi, 1995a).

Le principe de fonctionnement repose sur celui du MOSFET. Dans un substrat de silicium dopé P (cas d'un MOSFET canal N), sont implémentées deux zones de dopage N (le drain et la source) auxquelles sont appliquées des électrodes métalliques. La zone située entre le drain et la source est le canal. Elle est recouverte d'une fine couche isolante qui porte une métallisation constituant l'électrode grille. L'application entre la grille et la source d'une tension  $V_G$  positive tend à repousser les trous majoritaires du substrat et à attirer sous la grille, les électrons porteurs minoritaires du substrat. Lorsque  $V_G$  devient supérieure à une tension de seuil  $V_T$ , la densité d'électrons sous la grille devient supérieure à la densité de trous et un canal de type N se forme, assurant la continuité entre le drain et la source : la circulation d'un courant entre source et drain devient possible. En présence du gaz à détecter, la couche chimiquement sensible induit une modification de la tension de seuil (fonction des différentes caractéristiques des matériaux constituant le composant) et entraîne finalement une variation de la tension ou du courant drain-source (Jaffrezic-Renault *et al.*, 1994; Zdanevitch, 2000).

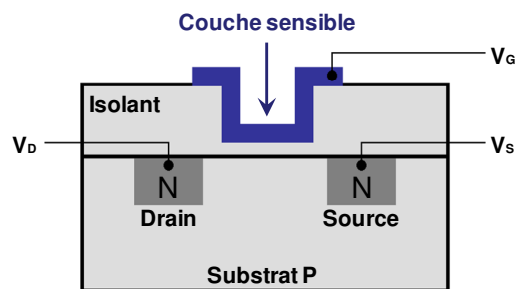


Figure I-4 : Schéma de principe d'un capteur chimique à effet de champ

### I.2.B Capteurs résonnants

Le principe de la piézoélectricité réside dans la production d'une polarisation électrique (et donc d'un champ électrique) sous l'effet de la compression du matériau tel que le cristal de quartz, qui possède cette propriété remarquable. L'effet inverse implique la déformation du cristal sous l'application d'un champ électrique. Cet effet peut-être utilisé dans les solides pour générer des ondes acoustiques (appelées aussi ondes élastiques) en appliquant une tension électrique alternative à un matériau piézoélectrique (Nieuwenhuizen et Nederlof, 1992). La première catégorie de microdispositifs employant ce principe à avoir été mis au point sont des systèmes à onde de volume (BAW pour Bulk Acoustic Wave) (Hlavay et

Guilbault, 1977). Il s'agit des résonateurs à quartz ou microbalance à cristal de quartz (QCM pour Quartz Cristal Microbalance). La seconde catégorie consiste en des dispositifs à ondes de surface (SAW pour Surface Acoustic Wave) (Wohltjen et Dessy, 1979). Pour ce type de capteurs une couche sensible est également nécessaire et détermine en premier lieu la sélectivité, le temps de réponse et la réversibilité.

**Les capteurs de type Microbalances à Cristal de Quartz (QCM)** sont constitués d'un support piézo-électrique (quartz) et de deux électrodes déposées sur les faces opposées du cristal. Quand une tension alternative à la bonne fréquence est appliquée aux électrodes, la résonance du cristal est excitée. Selon la coupe du cristal par rapport aux axes cristallographiques et selon l'orientation du champ électrique, différents types de champs de déformations peuvent apparaître : flexion, déformation longitudinale, élongation, cisaillement d'épaisseur, etc... La maille du cristal subit une déformation dynamique qui produit une onde élastique de volume se propageant d'une face à l'autre du cristal. La vitesse de l'onde, et par conséquent, la fréquence d'oscillation, est sensible aux changements dans la masse ou de densité du milieu qui est en contact avec la surface du cristal (D'Amico *et al.*, 1997).

Quand il est recouvert d'un film adsorbant, ce système est utilisable comme capteur chimique (Filippov *et al.*, 2007). Un vaste choix de couches actives similaires à celles utilisées pour les oscillateurs SAW est disponible, pour permettre une variation dans la gamme de réponses des capteurs. Les polymères organiques et les phases chromatographiques sont tout particulièrement utilisés pour recouvrir le cristal piézoélectrique (Grate *et al.*, 1997).

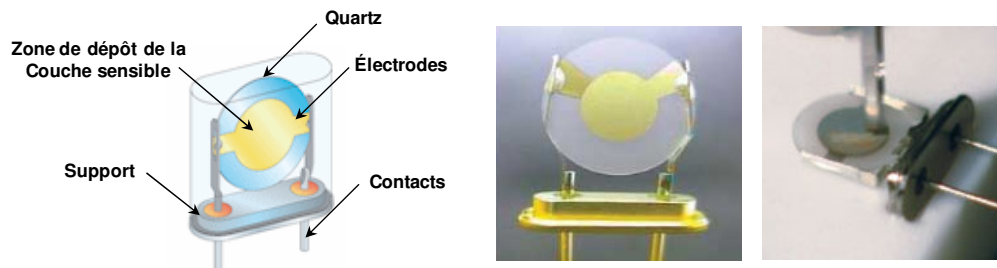


Figure I-5 : Schéma de principe et photographie d'un capteur Microbalances à Cristal de Quartz (source ctib-tchn)

Le principe de fonctionnement des **capteurs à ondes acoustiques de surfaces (SAW)** est proche de celui des capteurs microbalances de type QCM. Un capteur à ondes acoustiques de surface exploite la propagation d'une onde de surface sur un matériau piézoélectrique entre 2 électrodes interdigitées disposées à chaque extrémité du dispositif. A la différence des QCM, les électrodes des capteurs à ondes acoustiques de surface sont déposées sur la même face du cristal. L'onde de surface produite par excitation de l'une des électrodes à une fréquence appropriée, traverse la surface du système, puis est détectée par la seconde électrode. Les ondes de surface (notamment la plus utilisée, les ondes de Rayleigh) sont issues de déformations mécaniques à l'interface solide-air (Harsanyi, 1995a).

Les changements dans la masse, le rendement mécanique, ou les propriétés électriques de la couche de surface, provoqués par l'adsorption de vapeur, induisent des variations de la vitesse de propagation de l'onde (D'Amico *et al.*, 1997).

Le système SAW n'est pas particulièrement sensible aux propriétés chimiques du milieu en contact avec la surface. Il est donc nécessaire d'appliquer une couche mince à sa surface entre les deux électrodes, qui permet l'adsorption de composés particuliers. La propriété physique en jeu est la densité de masse de cette couche. Dotés de couches sélectives appropriées, les systèmes SAW présentent une sensibilité remarquable aux petites quantités de vapeurs chimiques. Une grande gamme de couches minces a été utilisée pour des capteurs de gaz

SAW, allant des couches métalliques jusqu'aux nombreux polymères organiques (Rebière, 1992; Grate *et al.*, 1997).

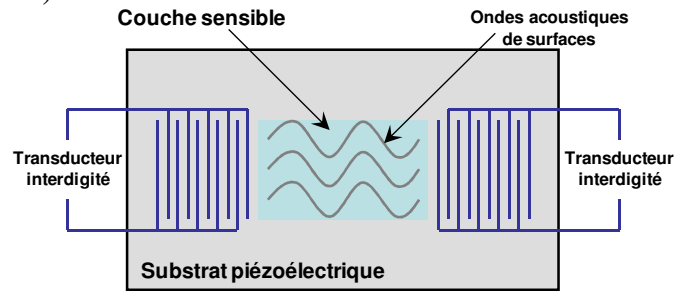


Figure I-6 : Schéma de principe d'un capteur à ondes acoustiques de surfaces

**Les capteurs à base de micropoutres** sont des microsystèmes complets utilisant des procédés de fabrication issus des microtechnologies (incluant parfois l'électronique de traitement dans une même puce) et communément classés dans la catégorie des MEMS (Micro-Electro-Mechanical Systems) (Lang *et al.*, 1999; Lochon *et al.*, 2006; Lochon, 2007). Ce type de capteur se base sur deux grands principes de transduction. Le premier principe utilise la mesure des déformations induites par des contraintes en surface, elles même provoquées par le contact avec l'espèce gazeuse. L'effet des contraintes se traduit ensuite en variation de fréquence, de façon quelque peu similaire au comportement d'une corde de guitare tendue. Les micropoutres utilisées par ce mode de transduction sont fabriquées à partir d'un matériau souple rencontré dans les procédés de microfabrication, à savoir le silicium, ses oxydes, ses nitrures et ses oxynitrures. Les dimensions typiques de ces poutres sont de quelques centaines de micromètres de longueur, quelques dizaines de micromètres de largeur et de quelques micromètres d'épaisseur.

Le deuxième principe des capteurs résonnants à micropoutre réside sur la mesure de la perturbation de la fréquence de résonance mécanique. Afin de réaliser des capteurs chimiques, une couche sensible est déposée sur la surface de la poutre. Le phénomène d'adsorption de la couche en présence des gaz induit une variation de la masse (augmentation de la masse) qui entraîne une variation de la fréquence de résonance de la structure. Ce type de micropoutre se base sur des matériaux rigides comme le silicium (Hierlemann *et al.*, 2000; Nugaeva *et al.*, 2005).

De nombreuses méthodes existent afin d'exciter la structure et d'en détecter les mouvements. Pour la mettre en mouvement, les méthodes les plus courantes sont l'excitation électromagnétique (Vancura *et al.*, 2003), l'excitation thermoélectrique (Hagleitner *et al.*, 2001), l'excitation par couche mince piézoélectrique (Yi *et al.*, 2002), l'excitation par céramique piézoélectrique (Bergaud et Nicu, 2000), et l'excitation électrostatique (Davis *et al.*, 2000). Pour la détection des mouvements, les méthodes les plus courantes sont la mesure optique externe (Datskos et Sauers, 1999), la mesure capacitive (Abadal *et al.*, 2001), la mesure piézorésistive (Boisen *et al.*, 2000), et la mesure par couche mince piézoélectrique (Adams *et al.*, 2003).

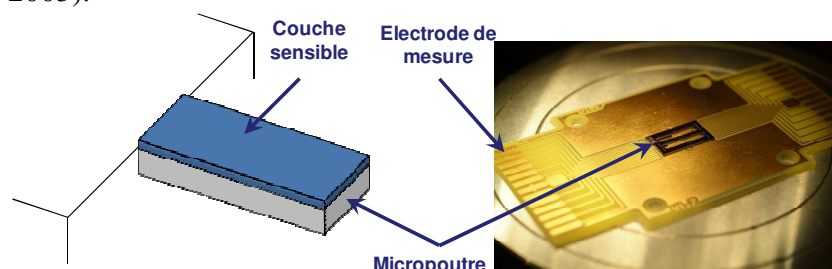


Figure I-7 : Schéma de principe et photographie d'une puce composée de capteur Micropoutres (<http://www.fondation.eads.net>)

### I.2.C Capteurs optiques

Les capteurs optiques les plus simples utilisent des indicateurs de changement de couleur en présence du gaz à détecter, traduisant une absorption optique à une longueur d'onde caractéristique d'une vibration moléculaire. D'autres capteurs optiques se basent sur une émission lumineuse, on parle alors de spectroscopie d'émission atomique (AES).

Les *capteurs colorimétriques* sont basés sur la réaction chimique entre un gaz à détecter et un réactif contenu dans un tube ou déposé en couche minces (Rakow et Suslick, 2000). L'introduction du gaz implique une variation de couleur du réactif. La concentration est proportionnelle à l'intensité de coloration.

La *fluorescence UV* est le nom donné à un phénomène général d'émission d'énergie lumineuse qui se produit lorsqu'une molécule préalablement excitée par un rayonnement UV, réémet, lors de la transition secondaire, une radiation bien caractéristique des électrons qui retombent à leur état initial (Fernández-Sánchez *et al.*, 2004).

Les capteurs optiques s'appuient sur une source lumineuse (radiations optiques) permettant d'exciter les modes de vibration spécifiques des liaisons chimiques des molécules. En exploitant certaines énergies du spectre électromagnétique, il est possible d'obtenir des informations sur la structure et donc d'identifier les molécules. En effet, les énergies absorbées ou émises par la molécule sont enregistrées pour une longueur d'onde fixe ou une gamme de longueurs d'onde et permettent de déterminer les principales fonctions chimiques de la molécule par comparaison entre le rayonnement incident et transmis à travers l'échantillon (Pejcic *et al.*, 2007). De nombreuses méthodes de mesure optique ont été développées, la plus répandue étant la *spectrométrie infrarouge* (Mizaikoff, 2003).

Les études sur ces capteurs optiques ont été réalisées en utilisant de nombreux instruments de laboratoire qui demandent un contrôle expérimental important. L'utilisation des **technologies à fibre optique** a augmenté la polyvalence des capteurs optiques et font d'eux des outils analytiques puissants. Des études ont porté sur les réponses caractéristiques de nombreux capteurs à fibre optique comportant un élément sensible (polymère) qui modifie la propagation de la lumière en présence du gaz à détecter (Bariain *et al.*, 2001; Bariain *et al.*, 2005). Ces capteurs sont dits extrinsèques lorsque l'élément sensible se situe en bout de fibre et intrinsèques lorsque que la surface de la fibre constitue l'élément sensible (Harsanyi, 1995a). Ces capteurs sont particulièrement utilisés pour la détection d'une large gamme de composés organiques dans l'eau et dans les sols (Yan *et al.*, 1995; Falate *et al.*, 2005).

### I.3 L'APPROCHE MULTI CAPTEURS

L'intérêt pour la recherche de capteurs sélectifs, sensibles, à faible coût, stables dans le temps et robustes pour la détection de composés organiques est reflété par les nombreuses publications sur ce sujet. Ces études montrent que la sensibilité dépend fortement des conditions expérimentales utilisées pour le développement du capteur. Beaucoup de capteurs montrent une sensibilité acceptable lors d'essais réalisés en laboratoire notamment grâce à la maîtrise des procédés pour la réalisation des couches sensibles. Cependant, très peu sont assez sélectifs pour distinguer des composés dans des mélanges complexes, ce qui ne permet pas leurs utilisations pour des applications *in situ*. La sélectivité est donc un problème majeur en ce qui concerne l'application des capteurs chimiques dans le contrôle des composés organiques dans la surveillance des environnements (Sanchez, 2005; Pejcic *et al.*, 2007).

De nombreuses études portent sur l'interprétation des phénomènes mis en jeu lors des mécanismes de détection, mais la complexité des mécanismes physico-chimiques incite à orienter les recherches vers le développement de systèmes annexes pour améliorer la sélectivité des capteurs. Les voies couramment envisagées pour optimiser la sélectivité des capteurs, notamment des capteurs à oxydes métalliques, sont l'utilisation de filtres permettant la modification de la couche sensible, la modulation de température, l'étude du paramètre transitoire de la réponse du capteur en présence de gaz ou encore l'analyse du bruit d'adsorption et de désorption.

L'amélioration de la sélectivité par l'utilisation de filtres regroupe deux catégories de filtres, les **filtres physiques** (ou tamis moléculaires) et les **filtres chimiques** (ou filtres catalytiques). La première catégorie utilise la filtration des molécules par leurs tailles par dépôt d'une membrane filtrante à la surface de la couche sensible. Les molécules de tailles supérieures aux pores de la membrane ne peuvent ainsi pas entrer en contact avec la couche sensible (Schweizer-Berberich *et al.*, 2000; Weh *et al.*, 2000).

La deuxième catégorie de filtre élimine les gaz interférents par une activité catalytique. Cette catégorie de filtre utilise également le dépôt d'une membrane sur la surface de la couche sensible (Montmeat *et al.*, 2002; Cabot *et al.*, 2003).

D'autres études ont été menées en observant le comportement de la réponse des capteurs en présence ou en absence du gaz à détecter.

La sensibilité des capteurs à oxydes métalliques dépend par exemple fortement de la température de fonctionnement du capteur. Une **modulation de la température de fonctionnement** du capteur implique un comportement différent de la réponse de ce capteur en fonction de la nature du gaz à détecter (un maximum de la courbe de conductance du capteur est atteint pour différentes températures en fonction de la nature du composé gazeux) (Heilig *et al.*, 1997; Vergara *et al.*, 2007).

Les **paramètres statiques et transitoires** de la réponse d'un capteur exposé à des gaz de natures différentes sont également observés. Le temps de réponse du capteur est le paramètre le plus utilisé mais la valeur statique lorsque la réponse est stable est un autre paramètre utilisable (Llobet *et al.*, 1998).

Une étude du **bruit d'adsorption et de désorption** dans les conducteurs polymères a montré qu'il existe également des informations liées à la nature des gaz adsorbés (Bruschi *et al.*, 1994).

Malgré la maîtrise des procédés de fabrication pour mettre en œuvre ces solutions pour améliorer la sélectivité des capteurs chimiques, la détection d'un gaz dans des mélanges complexes semble peu probable avec l'utilisation d'un capteur unique. La couche sensible des différentes technologies de capteurs ne présentant donc pas une sélectivité parfaite, la création de matrices de capteurs afin de pouvoir accroître l'information et donc améliorer la réponse semble nécessaire. Ces systèmes se basent sur une réponse préférentielle des différents capteurs composant la matrice à des familles de composés, sans nécessité d'une spécificité élevée. Les spectres des réponses d'un ensemble de capteurs doivent permettre de détecter ces composés par la définition d'une empreinte caractéristique du stimulus.

L'approche multi-capteurs est née en 1982, grâce aux différents progrès enregistrés dans l'informatique, dans l'électronique et dans les capteurs de gaz. Les systèmes utilisant des matrices de capteurs, « nez électronique », ont été développés dans le but, soit de remplacer l'analyse sensorielle, soit de l'assister (Gardner et Barlett, 1994; Canhoto *et al.*, 2004; Wilson et Baietto, 2009). Cependant, les architectures utilisées dans les « nez électroniques » ont

beaucoup en commun avec les systèmes multi-capteurs conçus pour la détection et la quantification de différents composés gazeux (Gardner et Bartlett, 2000b).

Par similitude avec l'analyse sensorielle humaine, l'approche multi-capteurs comporte trois phases d'analyses principales (Figure I-8). Une phase d'acquisition par une matrice de capteurs, une phase de traitement de l'information qui récupère et traite la réponse des différents capteurs, et une phase de comparaison et de décision qui permet de discriminer et d'identifier un échantillon (Canhoto *et al.*, 2004).

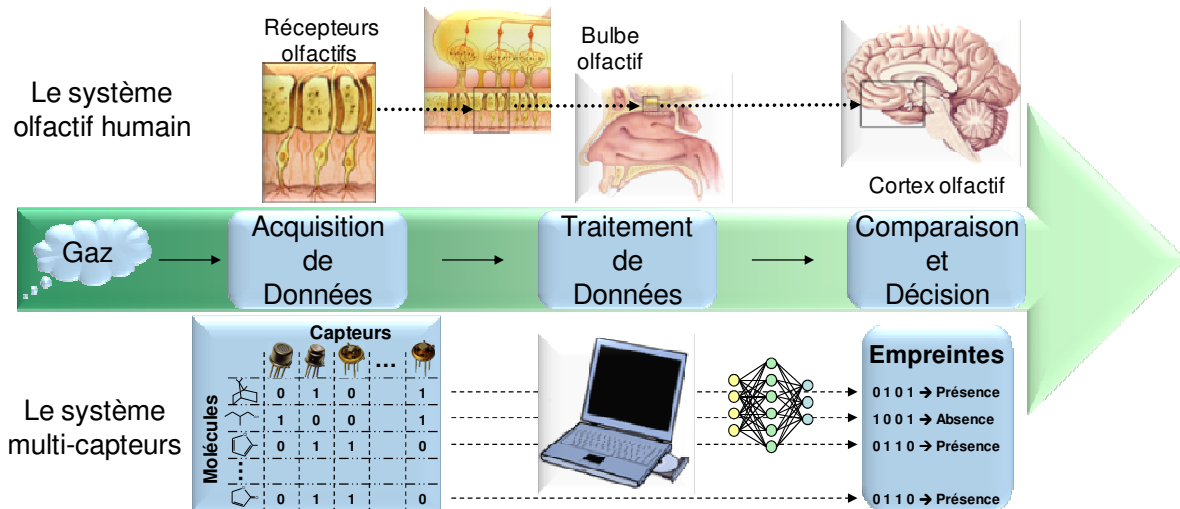


Figure I-8 : Similitude entre l'analyse sensorielle et l'analyse multi-capteurs (Göpel, 1998; Turner et Magan, 2004)

La phase d'acquisition récupère les informations transmises par les capteurs en fonction du comportement de la matrice face aux échantillons présentés en entrée.

Après une phase de transition due aux temps de réponse des capteurs et de stabilisation de la réponse, les données sont stockées dans une « librairie » qui traite les informations fournies. Cette librairie est une matrice dont les lignes contiennent les échantillons et les colonnes les variations de réponse des capteurs. On parle alors de phase de traitement des données.

Une banque de données, construite dans un premier temps, constitue une « phase d'apprentissage » pour le système. Cette banque permettra de conclure, par comparaison de l'échantillon prélevé avec différentes mesures réalisées précédemment, sur la nature de cet échantillon.

La phase de comparaison et de décision permet donc conclure sur la nature de l'échantillon à analyser. Cependant, les matrices utilisées dans une approche multi-capteurs contiennent généralement un nombre important de données.

Une approche multi-capteurs dans une matrice implique donc de pouvoir traiter un grand nombre de données et d'en extraire rapidement l'information pertinente, ce qui est rendu possible par le développement et l'utilisation des méthodes de reconnaissances de formes.

Pour interpréter de multiples échantillons, de nombreuses méthodes de traitement ont été développées et sont utilisées dans de nombreux domaines. On parle généralement d'empreintes pour les échantillons et de reconnaissance de forme pour le traitement.

Il existe deux familles principales de reconnaissance de forme pour lesquelles de nombreuses méthodes ont été développées, les méthodes de classifications et les méthodes d'exploration visuelle des données. La Figure I-9 présente les méthodes les plus répandues.



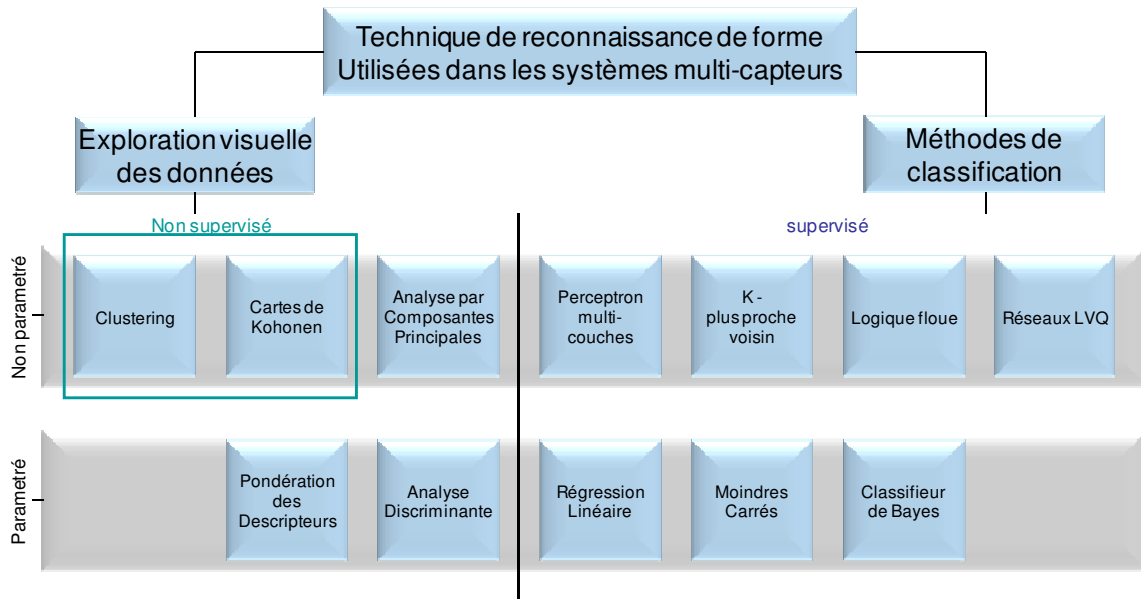


Figure I-9 : Récapitulatif des méthodes de reconnaissance de forme (Modifié de (Pearce, 1997; Ramalho, 1999; Gardner et Bartlett, 2000a)

Ces systèmes multi-capteurs font l'objet de nombreuses études principalement dans le domaine de l'agroalimentaire. Ils s'appuient sur des matrices de capteurs peu sélectifs qui se regroupent en deux familles, les matrices « monoclasses » composées d'une même famille de capteurs et les matrices « hybrides » constituées de différentes familles.

Les sensibilités obtenues en laboratoire et utilisant ces types de système, varient de 100 ppb à plus de 1000 ppm selon les cibles recherchées et les mélanges gazeux dans lesquelles elles se trouvent (Lee *et al.*, 2001; Penza et Cassano, 2003; Wolfrum *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2007b; Bailey *et al.*, 2008).

La littérature est riche en études travaillant sur le développement de matrice pour la détection des polluants gazeux notamment avec des matrices monoclasses composées de capteurs à oxydes métalliques (Wilson *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2002; Falasconi *et al.*, 2005; Wolfrum *et al.*, 2006; Vergara *et al.*, 2007), des polymères conducteurs (Hodgins, 1995; Xie *et al.*, 2006; Bai et Shi, 2007; Li *et al.*, 2007a; Lange *et al.*, 2008) ou dans une moindre mesure avec les capteurs à effet de champs (Paulsson et Winqvist, 1999; Morvan *et al.*, 2003; Lampe *et al.*, 2005). Des matrices monoclasses avec les capteurs résonnants ont également fait l'objet de recherche pour la détection de gaz, avec des capteurs QCM (Hierlemann *et al.*, 1995; Seyama *et al.*, 2002; Seyama *et al.*, 2004; Filippov *et al.*, 2007; Si *et al.*, 2007), des capteurs SAW (Bender *et al.*, 2003; Horrillo *et al.*, 2004; Fernandez *et al.*, 2007; Joo *et al.*, 2007) ou encore des matrices MEMS à micropoutres (Baller *et al.*, 2000; Hierlemann *et al.*, 2000; Battiston *et al.*, 2001; Lange *et al.*, 2002). Des matrices hybrides ont également été développées en associant des capteurs électrochimiques, des capteurs résonnants ou des capteurs optiques (Holmberg *et al.*, 1995; McEntegart *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2007b; Jin *et al.*, 2008; Sahgal et Magan, 2008).

#### I.4 SYSTEMES DEDIES AU MONDE MICROBIOLOGIQUE

Si beaucoup d'études travaillent sur la détection de polluants chimiques dans l'air, en revanche, les études traitant de la détection microbiologique en utilisant des systèmes multi-capteurs sont moins nombreuses. Ces dernières s'appuient sur la détection des COV issus du métabolisme des microorganismes.



Une recherche sur l'utilisation de systèmes multi-capteurs destinés à la détection de microorganismes dans l'air permet de mettre en évidence un intérêt pour ces systèmes depuis les années 90, notamment dans le domaine de l'agroalimentaire, et dans une moindre mesure pour les domaines de la santé, de la détection et/ou de la discrimination d'espèces microbiennes (bactéries et espèces fongiques) ou encore la protection de l'habitat et du patrimoine.

Dans le domaine de l'agroalimentaire, le développement des systèmes multi-capteurs (« nez électroniques) a permis notamment d'envisager leurs utilisations comme un indicateur de la détérioration de la qualité du grain (céréales) dans les lieux de stockage. Des recherches ont ainsi été menées *in vitro* pour identifier des gammes de composés volatils produits lors de développement fongique notamment ceux responsables de mauvaises odeurs lorsque le grain est contaminé (Magan et Evans, 2000).

Au cours des années 2000, l'intérêt pour ces systèmes s'est diversifié avec des études portant sur la détection et la discrimination d'espèces microbiennes (bactéries et espèces fongiques) ou encore pour la détection de développement fongique sur des matériaux de construction en s'appuyant sur les composés volatils émis par le métabolisme des microorganismes. Cependant, peu d'équipes travaillent sur l'utilisation de ces systèmes en tant que détecteur d'une activité microbiologique et les domaines d'études restent relativement proches. Ces différentes études cherchent à différencier des espèces microbiennes ou à distinguer différents types d'échantillons en fonction des composés produits par corrélation des résultats obtenus avec des techniques d'analyses traditionnelles, notamment la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

Les types de capteurs les plus communément utilisés pour ces systèmes, sont les oxydes métalliques ou les polymères conducteurs. Ces capteurs permettent d'obtenir des réponses rapides et réversibles et bien qu'ils soient peu spécifiques, ils peuvent être très sensibles à une gamme de différents composés. En sortie des systèmes, les réponses sont interprétées via différentes méthodes d'analyses telles que les Analyses par Composantes Principales (PCA), l'Analyse des Clusters (CA), les Analyses Discriminantes Linéaire et Quadratique (LDA et QDA) ou encore les Réseaux de Neurones Artificiels (ANN). Lors de ces études, les données obtenues sont généralement qualitatives et rarement quantitatives.

Le Tableau I-2 est ainsi une image non exhaustive de la littérature concernant l'utilisation des systèmes multi-capteurs en tant que détecteur d'une activité microbiologique.

Tableau I-2 : Etudes traitant de la détection microbiologique en utilisant des systèmes multi-capteurs

Domaine d'étude	Auteurs (lieu de l'étude)	année	type de capteurs	Analyse multivariable	Contexte - Principaux résultats
Agroalimentaire	Jonsson <i>et al.</i> (Suède)	1997	10 MOSFET, 4 oxydes métalliques,	ANN	Discrimination d'échantillons de grains (céréales) en fonction de l'intensité de l'odeur de moisi
	Schnürer <i>et al.</i> (Suède)	1999	1 capteur infrarouge		
	Keshri and Magan (Royaume-Uni)	2000	14 polymères conducteurs	PCA ; CA	Discrimination entre des souches fongiques non-toxinogènes et toxinogènes dans les matières premières agricoles
	Olsson <i>et al.</i> (Suède)	2000	10 MOSFET, 4 oxydes métalliques, 1 capteur infrarouge	PCA	Discrimination et analyse GC-MS des composés volatiles entre des échantillons de grains (céréales) moisés et sains
	Abramson <i>et al.</i> (Canada)	2005	12 oxydes métalliques		Discrimination de deux types d'ambiances (moisie ou saine) dans des lieux de stockage du grain (céréales)
	Needham <i>et al.</i> (Royaume-Uni)	2005	14 polymères conducteurs	PCA; DFA ; CA	Discrimination et analyse GC-MS des composés volatiles entre des échantillons analogues du pain moisés et sains
	Paolesse <i>et al.</i> (Italie)	2006	8 capteurs QCM	PCA ; PLS	Discrimination et analyse GC-MS des composés volatiles entre des échantillons de grains moisés et sains
Protection du patrimoine	Balasubramanian <i>et al.</i> (USA)	2007	32 polymères conducteurs	LDA ; QDA	Discrimination et analyse GC-MS des composés volatiles entre des échantillons de grains moisés et sains
	Hamilton <i>et al.</i> (Royaume-Uni)	2006	10 polymères conducteurs	PCA ; LDA	Discrimination entre des échantillons de bois contaminé et non contaminé par <i>S. Lacrymans</i> (mérule)
Biodétection	Canhoto <i>et al.</i> (Royaume-Uni)	2004	12 polymères conducteurs	CA	Discrimination entre des supports papier moisés et non moisés provenant d'une librairie
	Gibson <i>et al.</i> (Royaume-Uni)	1997	14 polymères conducteurs	ANN ; PCA	Discrimination entre différentes espèces de bactéries sur des substrats de croissance
Santé	Canhoto and Magan (Royaume-Uni)	2005	A: 14 polymères conducteurs B: 12 polymères conducteurs	PCA ; DFA ; CA	Différenciation d'échantillons contaminés par différentes espèces microbiennes (fongiques et bactériennes) avec 2 systèmes multi-capteurs
	Dutta <i>et al.</i> (Royaume-Uni)	2005	32 polymères conducteurs	PCA ; CA ; SOM...	Développement de méthodes de classification (gestion des données) avec deux espèces de bactéries responsable d'infections dans les hôpitaux
	Bailey <i>et al.</i> (Royaume-Uni)	2008	8 polymères conducteurs		Détection de composés volatiles cibles produit par des bactéries sur des blessures superficielles
	Schiffman <i>et al.</i> (USA)	2000	15 oxydes métalliques	LDA ; PLS	discrimination entre 5 espèces fongiques cultivées sur substrats de croissance
	Kuske <i>et al.</i> (Belgique ; Espagne)	2006	12 oxydes métalliques	PCA	Détection de 4 espèces fongiques sur différents matériaux de construction

Avec : **PCA** : Analyses par Composantes Principales ; **CA** : Analyse des Clusters ; **LDA/QDA** : Analyses Discriminantes Linéaire et Quadratique ; **ANN** : Réseaux de Neurones Artificiels ; **SOM** : carte auto-organisatrice ; **DFA** : Analyse Fonctionnelle Discriminante ; **PLS** : Régression par moindres carrées partielles

Ainsi, différentes recherches étudient l'utilisation potentielle de systèmes multi-capteurs pour l'évaluation de la qualité de grains dans une zone de stockage vis-à-vis d'une contamination fongique. Ces résultats montrent la possibilité de détecter des échantillons contaminés par différentes espèces fongiques (Jonsson *et al.*, 1997; Schnürer *et al.*, 1999; Keshri et Magan, 2000; Magan et Evans, 2000; Olsson *et al.*, 2000; Abramson *et al.*, 2005; Needham *et al.*, 2005; Paolesse *et al.*, 2006; Balasubramanian *et al.*, 2007).

En 2006, Hamilton *et al.* montrent qu'il est possible de discriminer, en laboratoire, des échantillons de bois non contaminés, d'échantillons contaminés par *Serpula lacrymans* (mérule) en utilisant un système multi-capteurs composé de polymères conducteurs (Hamilton *et al.*, 2006).

Des études similaires ont également utilisé, toujours en laboratoire, des systèmes multi-capteurs afin de détecter des métabolites volatils produits par des bactéries (Gibson *et al.*, 1997; Dutta *et al.*, 2005; Bailey *et al.*, 2008). L'utilisation de capteurs polymères montre des résultats encourageants pour la détection de cibles volatiles. Un travail sur les chaînes (fonctionnalités) des polymères conducteurs reste cependant nécessaire afin d'optimiser leurs sensibilités et leurs sélectivités à différents composés cibles (Li *et al.*, 2007a; Bailey *et al.*, 2008).

En 2005, Canhoto et Magan utilisent des systèmes multi-capteurs composés de polymères conducteurs pour discriminer en laboratoire des échantillons contaminés par différentes espèces fongiques et bactériennes. Cette étude montre qu'il est possible de différencier des échantillons sains ou des échantillons contaminés par différentes espèces de bactéries en exposant les capteurs aux composés volatils produits par ces bactéries. Des résultats similaires ont été obtenus avec une contamination fongique (*A. fumigatus*) (Canhoto et Magan, 2005).

Ce même système a également été utilisé lors d'une étude pour la détection de moisissure sur des papiers de librairie (Canhoto *et al.*, 2004). Les résultats obtenus montrent une nouvelle fois que la discrimination entre support moisi / non moisi est possible.

La distinction entre 5 espèces fongiques (cultivées sur substrats de croissance) couramment retrouvées dans les environnements intérieurs a également été réalisée lors d'une étude réalisée par Schiffman *et al.* en 2000, avec l'utilisation d'un système multi-capteurs composé de 15 oxydes métalliques (Schiffman *et al.*, 2000). De même, Kuske *et al.* ont travaillé sur la détection de 4 espèces de moisissures se développant sur différents matériaux de construction en utilisant un système multi-capteurs composés de 12 oxydes métalliques (Kuske *et al.*, 2006).

En 2000, Schreiber a étudié la possibilité d'utiliser un nez électronique pour évaluer la qualité de l'air perçue à l'intérieur des locaux et pour détecter la présence des moisissures dans des bâtiments. Deux nez électronique commerciaux MOSES II et KAMINA ont été utilisés. Les résultats des expériences avec MOSES II ont montré qu'une évaluation de la qualité de l'air perçue était possible. La détection de trois espèces de moisissures (*Aspergillus niger*, *Aspergillus versicolor* et *Cladosporium sphaerospermum*) développées sur un substrat de croissance (*malt-extract agar*) a été réalisée. Une ACP permet de déterminer la présence de moisissure mais ne permet pas de différencier les différentes espèces. L'auteur propose d'améliorer les résultats par un prélèvement indirect et de réaliser d'autres d'expériences (Schreiber, 2000; Kuske *et al.*, 2005).

Les limites principales des systèmes multi-capteurs sont leurs fortes sensibilités à l'humidité, la dérive et la pollution des couches sensibles des capteurs. L'instabilité des capteurs compromet l'utilisation des bases de données servant à la reconnaissance de formes. En dépit de ces inconvénients, les améliorations dans les technologies de fabrication des capteurs ainsi que l'utilisation de protocole précis augmentent le potentiel d'utilisation des systèmes multi-capteurs comme outils analytique. De plus, ces instruments fournissent une technique

d'échantillonnage rapide, simple, non envahissante et non destructive, pour la détection et l'identification d'une gamme de composés volatils et ne nécessitent pas une formation complexe pour le technicien utilisant ce type de système (Canhoto *et al.*, 2004; Bailey *et al.*, 2008).

Actuellement, les études sont réalisées en laboratoire avec des échantillons ayant un bruit de fond stable (COV émis par les supports, matériaux). En effet, lors de ces études le bruit de fond généré par un unique support est connu (environnement de référence) et peut donc être retranché aux signaux émis par les capteurs. Cette constatation ne rend pas directement possible l'utilisation de ces systèmes multi-capteurs dans des environnements constitués de différents matériaux dont les émissions ne sont pas maîtrisées et où un environnement de référence stable est impossible à obtenir (cas d'un logement par exemple).

De plus, lors de ces études, les concentrations microbiennes ne sont pas représentatives d'un environnement réel. En effet, le taux de charge (surface contaminée / volume d'air) des échantillons augmente « artificiellement » la réponse des capteurs aux moisissures (rapport signal / bruit optimal).

Les tests préliminaires réalisés à partir de capteurs polymères laissent penser qu'une détection de moisissures à partir de ces capteurs serait envisageable (Joblin *et al.*, 2010b). Cependant, à l'heure actuelle, les capteurs restent insuffisamment spécifiques pour permettre une utilisation *in situ*.

En parallèle des études portant sur ces solutions pour optimiser la sélectivité intrinsèque des capteurs chimiques, un travail sur l'échantillon en amont du capteur est également envisagé par séparation du mélange gazeux. Dans cette optique, la séparation se fait par chromatographie qui permet d'exposer le(s) capteur(s) aux différents composés d'un mélange complexe les uns après les autres. L'évolution des technologies de l'électronique et en particulier de la micro-électronique, a permis d'imaginer, grâce aux développements des procédés de fabrication, la miniaturisation de microsystèmes d'analyses tels que la chromatographie.

## II MICROSTRUCTURES DEDIEES A LA METROLOGIE DES GAZ

Depuis les années 80, les progrès dans le domaine de la miniaturisation, avec notamment les technologies MEMS (*Micro Electro Mechanical Systems*), ont permis le développement de microsystèmes dans de nombreux domaines d'applications (Angelescu *et al.*, 2007). Parmi ces domaines, la miniaturisation des systèmes d'analyses chimiques ont fait l'objet de nombreuses études, avec notamment le développement de la microfluidique. En 1990, Manz *et al.* introduisent la notion de « systèmes miniaturisés d'analyse chimique totale » (pour miniaturized total chemical analysis systems), ou encore « microTAS » (pour micro total analysis systems). Ce terme introduit l'objectif de ces systèmes qui consiste à développer, sur un même substrat, un outil d'analyse complet à des dimensions micrométriques (Manz *et al.*, 1990).

Au cours des 15 dernières années, la notion de « laboratoire sur puce » (*Lab-on-a-chip*) s'est alors développée lorsque des études ont porté sur la miniaturisation et l'intégration sur un substrat à l'échelle micrométrique, de dispositifs comprenant une ou plusieurs fonctions d'un système d'analyse classique de laboratoire (de Mello, 2002).

Le concept de ce type de microsystèmes d'analyses est donc d'effectuer, sur un même substrat micro-usiné, un certain nombre d'opérations concernant le prélèvement, le transfert, la séparation ou encore l'analyse d'un échantillon. La miniaturisation de systèmes tels que la

chromatographie montre un intérêt particulier pour des applications portables, fiables et faibles coûts.

Les principales caractéristiques recherchées dans la miniaturisation sont le gain en volume et en masse, la réduction de la consommation et du coût ou encore la robustesse. À fonction équivalente, les microsystèmes apportent un gain en volume et en masse. Inversement, ils permettent de réaliser plus de fonctions dans le même volume. Du fait des faibles masses mises en jeu, la consommation des microsystèmes est souvent inférieure à celle du système équivalent (même si cela peut se faire au prix d'une diminution du rendement).

La réduction du coût est également souvent mise en avant, en raison des techniques de fabrication collectives caractéristiques des microsystèmes, qui permettent de diminuer très fortement le coût unitaire des pièces produites. Toutefois, ceci n'est valable que pour de forts volumes de production (centaines de milliers de pièces par an ou plus). En dessous de ces quantités, la réduction du coût de production est moins sensible, et elle est en outre en partie occultée par le coût de développement, qui est important quelle que soit la taille de la série de production.

Enfin, il est possible que ces systèmes présentent une meilleure robustesse que leurs équivalents macroscopiques, en raison d'une part de leur faible taille (masses mises en jeu en diminution plus rapide que la raideur), et d'autre part de l'utilisation de matériaux proportionnellement beaucoup plus robustes (car monocristallins, par exemple). Ceci reste toutefois à quantifier (Mir et Martinez, 2002).

Il faut noter qu'un microsysteme n'est pas une réduction d'échelle d'un système macroscopique, mais bien une conception nouvelle de la fonction souhaitée, tirant parti des nouvelles caractéristiques accessibles ou de nouveaux principes de transduction (rapports surface/volume très importants, par exemple).

Dans ce contexte de miniaturisation, l'évolution des technologies de l'électronique et en particulier de la micro-électronique, a permis d'imaginer, grâce aux développements des procédés de fabrication, la miniaturisation de microsystèmes d'analyses tels que la chromatographie. De nombreuses études ont ainsi décrit des microchaînes d'analyses séparant les gaz par chromatographie couplées avec un ou plusieurs « module(s) » de prétraitement ou de système de détection. La capacité à créer des instruments portables et robustes, pour des applications *in situ* de mesure chimique, a également été une incitation importante pour les développements récents de ces microstructures.

## II.1 MICROSTRUCTURES D'ECHANTILLONNAGE : PRECONCENTRATEURS

L'étape de préconcentration se trouve en amont du système d'analyse. L'utilisation d'un préconcentrateur est requise pour l'utilisation de systèmes chromatographiques lorsque la résolution de la colonne chromatographique est trop faible ou que la sensibilité des détecteurs utilisés est limitée par les faibles concentrations des composés à analyser (ppb) (Tian *et al.*, 2005).

La préconcentration se base sur le principe d'accumulation. Lors de l'utilisation d'un préconcentrateur, le gaz à analyser traverse le dispositif dans lequel les composés sont accumulés, durant la phase de collecte, sur un matériau adsorbant. Les molécules piégées sur le matériau sont ensuite désorbées thermiquement et injectées dans une colonne chromatographique pour être séparées puis analysées. Les composés thermiquement libérés permettent d'obtenir, en sortie de colonne, des pics de désorption avec une intensité relativement élevée par rapport au bruit de fond de l'échantillon. Cette étape de concentration

augmente donc l'efficacité de séparation de la colonne et les pics de forte concentration augmentent la sensibilité de l'analyse (Gracia *et al.*, 2008).

Une étude complète sur l'analyse de l'air par chromatographie a été reportée par (Helmig, 1999). Cette étude montre que la préconcentration de l'échantillon est l'une des procédures les plus courantes pour obtenir de bonne performance de sensibilité et de sélectivité en chromatographie (Lu *et al.*, 2003b).

Les préconcentrateurs traditionnels sont des tubes de courtes longueurs contenant le matériau adsorbant et thermiquement désorbés par insertion dans un support chauffant (Mitra *et al.*, 1996; Groves *et al.*, 1998; Nakamoto *et al.*, 2000; Lu et Zellers, 2002; Kroupa *et al.*, 2004; Thammakhet *et al.*, 2005; Libardoni *et al.*, 2006). Ces tubes préconcentrateurs sont d'une dizaine de centimètres et consomment beaucoup de puissance durant la désorption thermique. Ces tubes induisent des problèmes dus à des volumes morts importants et une efficacité de chauffe limitée en raison de leur masse thermique. Ils ont donc besoin d'une étape de « focalisation » additionnelle d'azote liquide généralement appelés « piège à froid » (Gracia *et al.*, 2008).

Au début des années 2000, de nombreuses études ont développé des microstructures de préconcentration et ont montré les avantages de cette approche. En effet, l'utilisation d'un module de préconcentration reste nécessaire lorsque la concentration des composés à analyser est trop faible et que la sensibilité du détecteur en sortie du système d'analyse n'est pas suffisante. De plus, la miniaturisation des dispositifs de préconcentration permet une consommation énergétique plus faible lors de la désorption et une meilleure efficacité de chauffe liée à une plus faible masse thermique. Le prétraitement des échantillons est un facteur de performance important et joue un rôle déterminant dans l'analyse des gaz utilisant la chromatographie.

L'objectif de la miniaturisation des préconcentrateurs est l'obtention de structures robustes, avec un ratio surface / volume élevé, une faible masse thermique (rapidité de chauffe), une faible résistance au passage du flux d'air, une facilité d'intégration avec un système de chromatographie gazeuse ou encore une haute capacité d'adsorption (Alfeeli *et al.*, 2008; Gracia *et al.*, 2008).

Le processus d'adsorption dans les préconcentrateurs de gaz est basé sur l'interaction des molécules gazeuses avec le matériau adsorbant. Ce processus est limité par le nombre de « sites d'adsorption » disponibles et ce facteur limite les performances du préconcentrateur. Cette limite est connue sous le nom de « volume de perçage » ( $V_b$ ) et est utilisée par convention comme paramètre de performance d'un préconcentrateur (Alfeeli *et al.*, 2008). Le volume maximum, d'échantillon de gaz, pouvant traverser la structure, sans saturer les sites disponibles, est évalué par la formule suivante :

$$V_b = \frac{W_e}{C_0} \left[ W + \frac{\rho_B Q}{k_v} \ln \left( \frac{C}{C_0 - C} \right) \right]$$

Où  $W_e$  est la capacité d'adsorption (mg/g),  $C_0$  est la concentration de gaz injectée à l'entrée du préconcentrateur (mg/mL),  $Q$  est le débit (mL/min),  $W$  est la masse de l'adsorbant (g),  $\rho_B$  est la densité de remplissage,  $k_v$  est la constante cinétique,  $C$  est la concentration de gaz à la sortie du préconcentrateur (mg/mL).

Différentes configurations ont été utilisées pour développer des micropréconcentrateurs, notamment l'utilisation de microcanaux, ou encore de microstructures 3D.

Tian *et al.* présentent un micropréconcentrateur et montrent les améliorations de l'efficacité de chauffe et des performances de désorption obtenues par ce type de structure en réduisant les volumes morts, la masse thermique et la pression dans la structure (Tian *et al.*, 2003; Tian *et al.*, 2005). Ces études montrent la possibilité de « piéger » 30 COV à l'aide d'un micropréconcentrateur.

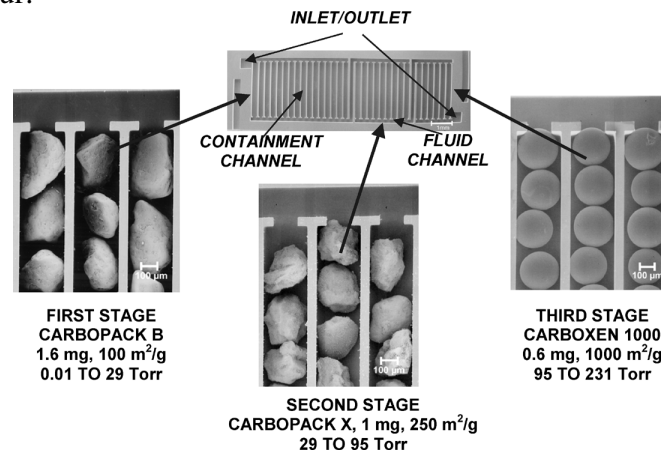


Figure I-10 : Représentation du Micropréconcentrateur (Tian *et al.*, 2005)

L'efficacité de chauffe de ces structures est démontrée dans la majorité des études utilisant ce type de microstructure pour la concentration d'échantillon. Aussi, Ruiz *et al.* travaillent sur le comportement thermique de ces structures en cherchant à obtenir une efficacité optimal pour de basses températures (Ruiz *et al.*, 2007).

En 2000, un micropréconcentrateur est développé par les laboratoires Sandia (Manginell *et al.*, 2000; Lewis *et al.*, 2006) dans le projet de développement d'une microchaîne d'analyse (*MicroChemLab*) applicable à la détection de composés chimiques dans différents domaines (militaires, pharmacie, pétrochimie, agroalimentaire...).

Zellers *et al.* décrivent également l'utilisation d'un micropréconcentrateur dans un système analytique basé sur des microcapteurs conçu pour déterminer des mélanges complexes de composés organiques volatils rencontrés dans les milieux intérieurs de travail à des niveaux de l'ordre du ppb (Zellers *et al.*, 2007).

Ces dernières années, de nombreuses autres études ont développé des micromodules de préconcentration (Kim et Mitra, 2003; Bae *et al.*, 2007; Ivanov *et al.*, 2007; Pijolat *et al.*, 2007; Alfeeli *et al.*, 2008; Gracia *et al.*, 2008).

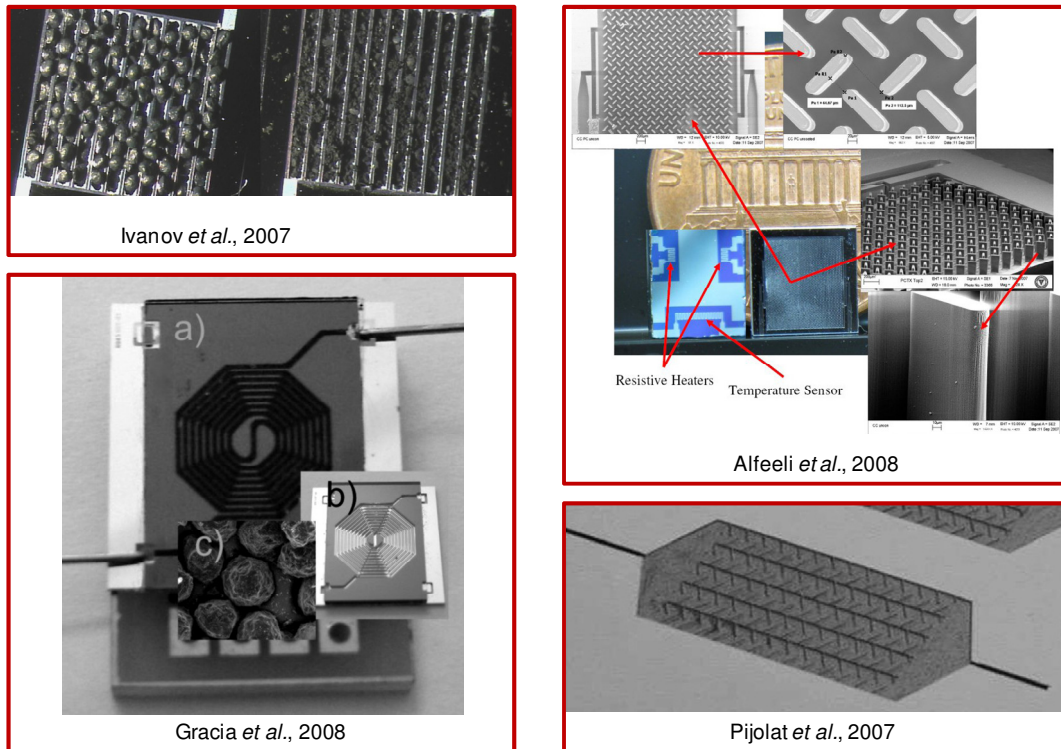


Figure I-11 : Exemples de réalisation de microstructures de préconcentration

L'intégration de ces micromodules de préconcentration, pour le développement de microsystème d'analyse de mélanges gazeux complexes, consiste à combiner ce module de préconcentration avec un module de séparation (microcolonne) et un module de détection (microcapteurs) (Tian *et al.*, 2003; Lambertus *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2005; Tian *et al.*, 2005; Agah *et al.*, 2006; Lewis *et al.*, 2006; Zellers *et al.*, 2007).

Ainsi, ces études montrent ainsi l'intérêt de développer ces microstructures de préconcentration pour augmenter l'efficacité des microsystèmes d'analyse des gaz basés sur la chromatographie. Dans le cas d'un mélange gazeux complexe, ces micropréconcentrateurs doivent être associés à une technique de séparation (chromatographie) permettant, *in fine*, son analyse.

## II.2 MICROSTRUCTURES DE SEPARATION

La chromatographie en phase gazeuse (CPG), est une méthode d'analyse par séparation qui s'applique aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition. Elle permet ainsi l'analyse de mélanges éventuellement de natures très complexes et de volatilités très diverses.

Le cœur d'un système de chromatographie est la **colonne**, qui est un tube plus ou moins perméable aux gaz renfermant une substance active, solide ou liquide, appelée **phase stationnaire**. Le processus chromatographique est discontinu. L'échantillon gazeux à analyser, est injecté dans la colonne et est ensuite transporté à travers la colonne par un **gaz vecteur** inerte (hélium He, diazote N<sub>2</sub>) appelé **phase mobile**. Les molécules vont ainsi parcourir la colonne avec un temps de rétention proportionnel aux propriétés intrinsèques des différentes molécules (point d'ébullition, fonction chimique, taille, masse, structure...) et à leurs affinités avec la phase stationnaire (polarité...). Les molécules vont ainsi sortir progressivement de la colonne pour être détectées par différentes méthodes de détection existantes.



Une introduction plus complète sur la chromatographie en phase gazeuse est proposée en Annexe IV de ce mémoire présentant son principe et quelques fondements théoriques.

Comme pour les microstructures de préconcentration, avec les progrès dans le domaine de la miniaturisation, des études ont été menées pour développer des microstructures de séparation, les microcolonnes chromatographiques. Dans ce contexte de miniaturisation, en 1979, Terry *et al.* présentent ce qui est généralement considéré comme le premier exemple d'outils d'analyse chimique micro-fabriqués (Terry *et al.*, 1979).

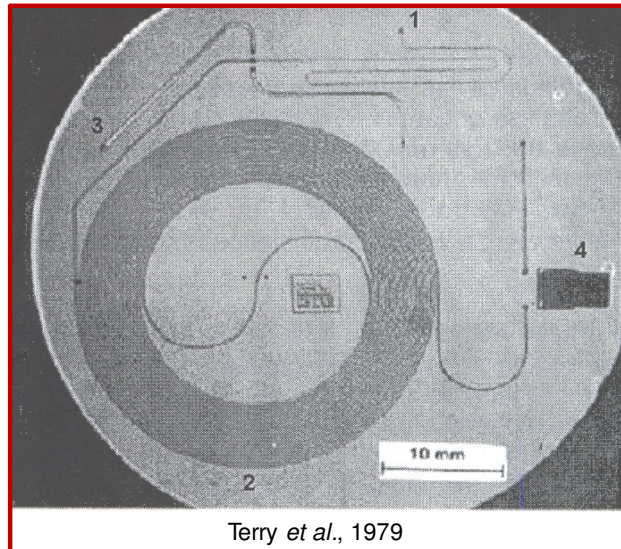


Figure I-12 : Photographie du microsysteme chromatographique proposé par Terry *et al.*

Cette étude décrit le concept, la fabrication et les tests d'un chromatographe en phase gazeuse intégré sur un « wafer » de silicium. Ce système incorpore le système d'injection de l'échantillon, une colonne de longueur 1,5m et de section rectangulaire (200 $\mu$ m de large et 30 $\mu$ m de profondeur), ainsi qu'un détecteur à conductivité thermique (TCD) fabriqué séparément et directement monté sur la surface du substrat. En utilisant l'hélium comme gaz porteur, le dispositif réalisé a été utilisé pour séparer et détecter les mélanges gazeux d'hydrocarbures en moins de dix secondes. Ce système a montré des résultats encourageants, cependant la capacité de résolution de la microcolonne reste faible comparée aux colonnes standards. De plus, les difficultés rencontrées pour assurer le dépôt de la phase stationnaire de manière homogène sur toute la longueur rend difficile la possibilité de développer en série des colonnes identiques (de Mello, 2002).

De part ces constats, les études suivantes ont travaillé sur le développement de microcolonne permettant le dépôt de phase stationnaire dans des microcanaux. Par exemple, en 1994, les études de Reston et Kolesar reportent également le développement d'un système incorporant un injecteur d'échantillon miniature, une colonne de 90 cm de longueur avec une section rectangulaire (300 $\mu$ m x 10 $\mu$ m) et un double détecteur (un capteur chimique et détecteur à conductivité thermique) (Kolesar et Reston, 1994; Reston et Kolesar, 1994; Kolesar et Reston, 1998). Le dépôt de la phase stationnaire sur les parois de la colonne a été réalisé dans cette étude avant le processus de liaison de la couche de pyrex sur les canaux micro-usinés. L'efficacité de cette approche a été démontrée par la séparation de deux composés, l'ammoniaque et du dioxyde d'azote dans un délai de 30 min. Cependant, la séparation de ces composés avec ce microsysteme reste difficile.

Une approche alternative pour développement de microcolonne à haute efficacité est l'utilisation des films d'acides aminés déposés par plasma. Comme les phases stationnaires classiques, ces films fournissent de bonnes performances chromatographiques. En 1997, Hanno *et al.* ont utilisé ces films comme phase stationnaire dans une microcolonne de 2m de longueur avec un canal micro-usiné par gravure isotrope de section de 100µm de large et 10µm de profondeur. Ce système a été utilisé pour la détection du méthane en 600ms avec une haute efficacité (Hanno *et al.*, 1997).

D'autres études se sont également intéressées à l'utilisation de la chromatographie comme moyen d'amélioration de sélectivité de capteurs. Dans cette optique, ces études couplent les capteurs qui sont utilisés comme détecteur, avec une colonne chromatographique (Wanekaya *et al.*, 2005; Zampolli *et al.*, 2005; Sanchez *et al.*, 2006).

Depuis le premier rapport de Terry *et al.*, les chercheurs ont décrit des microchaînes d'analyses séparant les gaz par chromatographie couplées avec un ou plusieurs « module(s) » de prétraitement ou de système de détection (Zellers *et al.*, 2004). Le développement de système chromatographique sur puce a été en grande partie motivé par les performances obtenues grâce à la miniaturisation et l'intégration. Cependant, la capacité à créer des instruments portables et robustes, pour des applications *in situ* de mesure chimique, a également été une incitation importante pour les développements récents de ces microstructures. Différentes structures de microcolonnes ont alors été explorées pour améliorer les performances de ces microstructures afin de pouvoir développer un outil d'analyse complet.

Une de ces études les plus notables est celle du laboratoire national Sandia. En effet, en 1996, le laboratoire national Sandia aux Etats-Unis a entrepris le développement d'un microsystème permettant la détection d'agents toxiques gazeux potentiellement présents dans l'environnement. En 2000, une microcolonne de 86cm de longueur est réalisée avec des microcanaux gravés par DRIE (Deep Reactive Ion Etching) sur 400µm de profondeur pour une largeur de 100µm. la séparation entre les canaux étant de 25µm, la surface de la puce est de 1,44cm<sup>2</sup>. Cette colonne a été utilisée pour la séparation de gaz et de composés organiques volatils (Frye-Mason *et al.*, 2000). En 2003, le système « MicroChemLab » utilise une connexion séquentielle de trois modules, un préconcentrateur pour accumuler les cibles d'intérêts, une colonne pour la séparation de l'échantillon et une matrice de capteur SAW comme détecteur. Cette étude montre l'importance de chacun de ces modules pour la sensibilité mais également la sélectivité. Le temps de rétention dans la colonne est utilisé pour identifier les molécules cibles détectées par le capteur. Ce système reste cependant utilisé uniquement pour des applications de sécurité nationale (Manginell *et al.*, 2003; Lewis *et al.*, 2006).

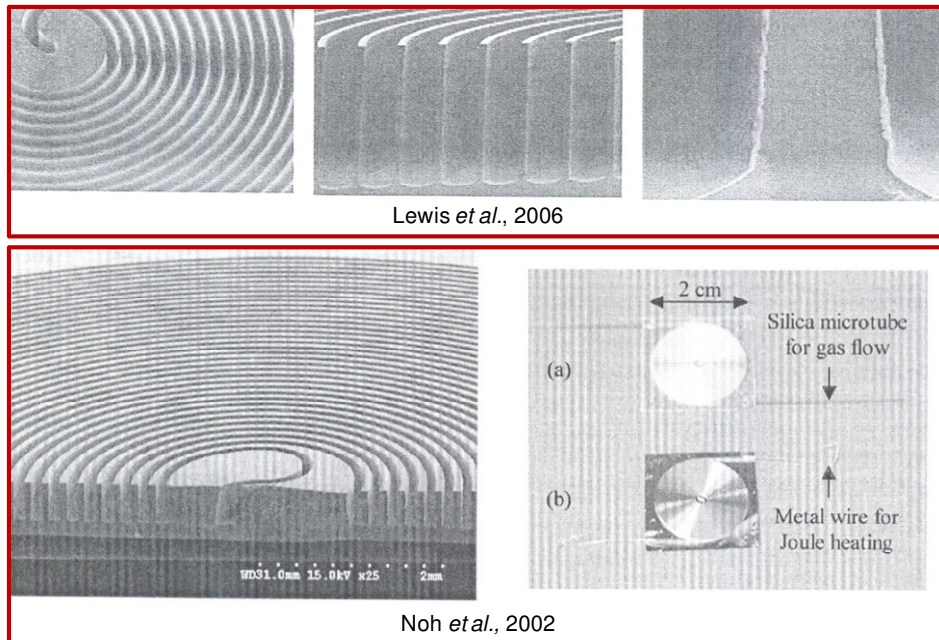


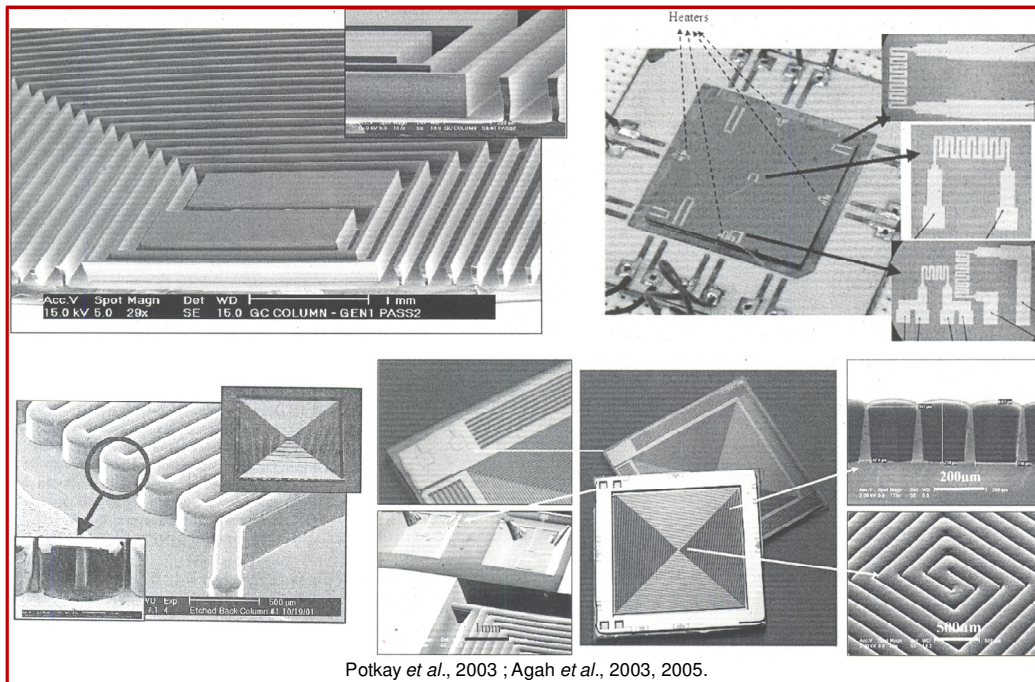
Figure I-13 : Réalisation de microcolonnes chromatographiques proposées par le laboratoire Sandia - MicroChemLab

En 2002, Noh *et al.* travaillent, dans le cadre des recherches pour le laboratoire Sandia, plus spécifiquement sur l'influence de la température sur le temps de rétention dans une microcolonne. Pour cela, une microcolonne (longueur 1m, largeur  $100\mu\text{m}$ , profondeur  $350\mu\text{m}$ ) a été développée en incorporant, dans la phase stationnaire, un film d'or comme élément chauffant. Cette colonne montre une rapidité de chauffe et de refroidissement supérieur à une colonne classique en silicium et verre de part sa capacité à fonctionner à basse température. La consommation de puissance est également moins élevée que pour une colonne classique (Noh *et al.*, 2002). En 2007, Reidy *et al.* travaillent également sur l'uniformité de chauffe de microstructure. Une microcolonne de 3m de longueur a ainsi été développée sur un substrat de silicium pour une superficie de  $3,2\text{cm}^2$ . Cette étude montre que la conductivité thermique du silicium permet, par l'utilisation de points de chauffe répartis sur la puce, une meilleure uniformité de la température. Lorsqu'un unique élément de chauffe est utilisé, une différence de température de  $10^\circ\text{C}$  sur la puce est observée pour une température recherchée d'environ  $80^\circ\text{C}$ . L'utilisation de quatre éléments de chauffe répartis sur la puce permet alors une variation de température inférieure à  $2^\circ\text{C}$  (Reidy *et al.*, 2007).

Depuis 2003, Potkay *et al.* ont également travaillé sur le développement et l'amélioration d'une microcolonne de 3m de longueur permettant la séparation de 16 composés gazeux en 75 secondes. Sur un wafer de silicium, la superficie de la puce est alors de  $3,2\text{cm}^2$  et les canaux ont pour dimension,  $150\mu\text{m}$  de large et  $260\mu\text{m}$  de profondeur et l'air est utilisé comme gaz vecteur (Potkay *et al.*, 2003). Une étude a été réalisée sur ce type de microcolonne en intégrant les éléments de chauffe et les capteurs de température pour contrôler la température de la structure ainsi que des capteurs de pression pour le contrôle du flux traversant la structure. Cette étude montre l'intérêt de l'utilisation de plusieurs points de chauffe pour l'homogénéité de la température de la structure. Les capteurs de pression permettent également de contrôler la pression dans la structure pour permettre une séparation reproductible (Agah *et al.*, 2005). Les chercheurs de cette équipe ont également travaillé sur le développement d'autres microstructures, ainsi des études ultérieures ont été menées pour améliorer et évaluer les performances afin de coupler des colonnes à un préconcentrateur et une matrice de capteur chimique (Agah *et al.*, 2003; Lambertus *et al.*, 2004).



D'autres méthodes de fabrication sont également envisagées pour le développement de microcolonnes, notamment dans le but de réduire la masse de la structure. Des colonnes à microcanaux de forme cylindrique ont alors été développées (Agah et Wise, 2005; Potkay *et al.*, 2006).



Potkay *et al.*, 2003 ; Agah *et al.*, 2003, 2005.

Figure I-14 : Images des réalisations de microcolonnes chromatographiques proposées dans les études de Potkay *et al.* et Agah *et al.*

Agah *et al.* travaillent également, sur le développement de colonne de longueur 25cm, sur une surface de 1,2cm<sup>2</sup>. L'utilisation de ces colonnes de faible masse avec des rampes de température de 10°C/s, a permis la séparation de 11 composés gazeux (alcane de C5 à C16) en moins de 10s. Les composés C5 à C8 sont séparés en moins de 10s dans une colonne à température ambiante, alors que les composés C10 à C16 sont séparés en moins de 20s avec une rampe de température (300°C/min) allant de 30 à 130°C. Cette étude propose donc l'utilisation de colonnes en parallèle utilisées à température différente pour réaliser une analyse rapide sans sacrifier l'efficacité de séparation (Agah *et al.*, 2006).

Zellers *et al.* présentent ainsi le développement d'un microsystème d'analyse de mélange gazeux, utilisant les différentes microstructures de préconcentration (Tian *et al.*, 2005), de séparation (Agah *et al.*, 2003; Lambertus *et al.*, 2004; Agah *et al.*, 2005) et de détection (Cai et Zellers, 2002; Steinecker *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2005) développées dans les différents études (Lu *et al.*, 2003a; Zellers *et al.*, 2004; Zellers *et al.*, 2007).

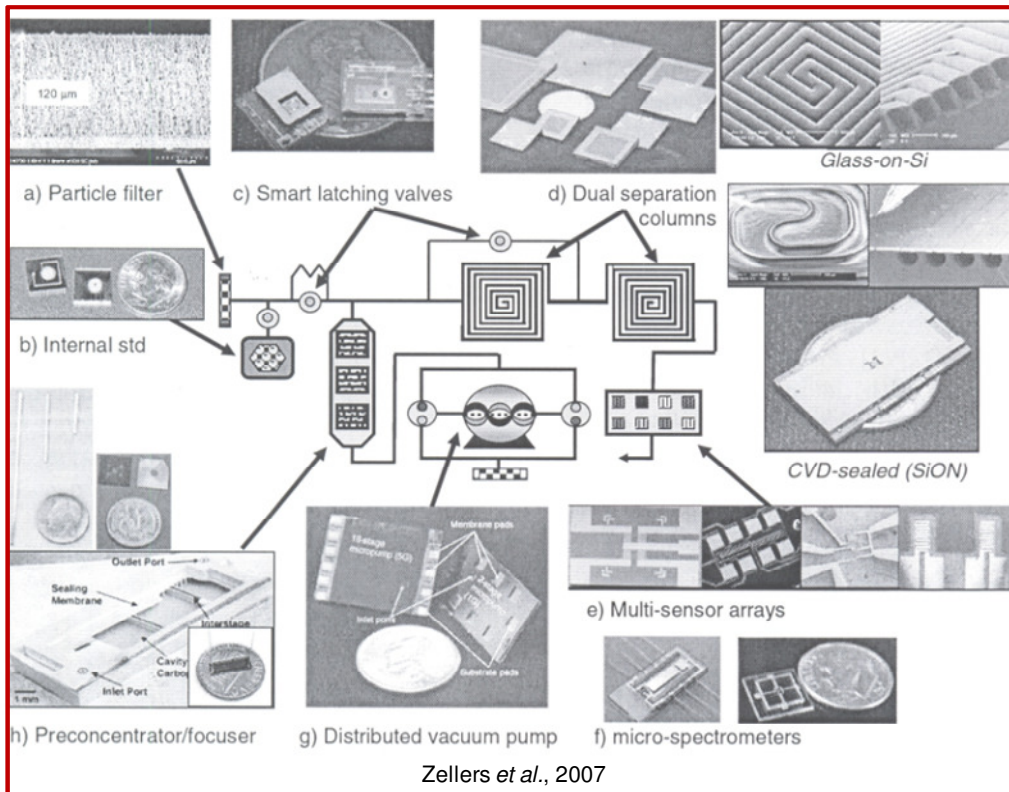


Figure I-15 : Réalisation de microstructures composant un microsystème d'analyse de mélange gazeux proposé par Zellers et al.

### III CONCEPTION DE MICROSYSTEMES

#### III.1 MATERIAUX DE FABRICATION

Le silicium est le matériau de base de l'industrie micro-électronique. Si ses propriétés électroniques sont connues et exploitées de longue date pour la réalisation de composants semi-conducteurs, ses caractéristiques mécaniques suscitent un intérêt depuis les années 1970 en relation avec la fabrication de structures rigides ou flexibles. Le silicium monocristallin est abondant et peu cher, et constitue un matériau très adapté à la miniaturisation (en-dessous du micromètre). Du point de vue cristallographique, le silicium est un cristal cubique dont la structure est celle du diamant dans laquelle deux réseaux cubiques à faces centrées imbriqués sont identifiés. Ils présentent des plans cristallins (100, 110, 111) qui jouent des rôles importants dans les gravures anisotropes (Figure I-16) (Beeby, 2004; Permuy *et al.*, 2004).

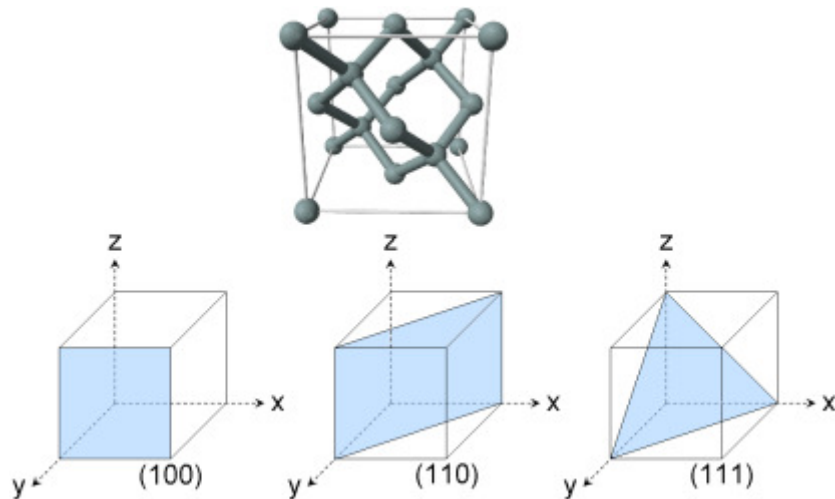


Figure I-16 : Maille élémentaire et plans cristallins du Silicium (Permuy *et al.*, 2004)

D'autres matériaux sont également employés dans la fabrication de microsystèmes comme les dérivés du silicium, l'oxyde ( $\text{SiO}_2$ ) et le nitrure ( $\text{Si}_3\text{N}_4$ ). Ils sont généralement utilisés pour réaliser des couches isolantes et protectrices.

Le  $\text{SiO}_2$  peut être réalisé par oxydation du silicium sous oxygène ou vapeur d'eau à haute température (900 à 1 200°C), pour des durées de traitements « raisonnables » (inférieures à 12 h). L'épaisseur de l'oxyde reste cependant limitée à moins de 2  $\mu\text{m}$ . Des procédés LPCVD (*Low Pressure Chemical Vapor Deposition*) et PECVD (*Plasma Enhanced Chemical Vapor Deposition*) permettent le dépôt de  $\text{SiO}_2$  et de  $\text{Si}_3\text{N}_4$  jusqu'à des épaisseurs de quelques micromètres, et cela à des températures relativement faibles, de l'ordre de 200 à 800°C (Charlot, 2002; Permuy *et al.*, 2004).

Le polysilicium déposé par LPCVD ( $\text{SiH}_4 \rightarrow \text{Si} + 2 \text{H}_2$ ), dopé ou non, est largement utilisé par l'industrie des semi-conducteurs. Depuis une dizaine d'années, ses propriétés mécaniques sont aussi exploitées pour la réalisation de structures flexibles intervenant dans certains capteurs. Constitué de petits cristaux agglomérés (de l'ordre d'une fraction de micromètre), les propriétés mécaniques du polysilicium dépendent aussi beaucoup des procédés de réalisation.

L'aluminium est couramment utilisé pour la réalisation de liaisons électriques peu résistives (résistivité des films de l'ordre de  $3 \cdot 10^{-8} \Omega \cdot \text{m}$ ). Certaines structures micro-usinées exploitent ses propriétés élastiques (poutres) et un coefficient de réflexion de la lumière visible supérieur à 90 % (miroir) (Beeby, 2004; Permuy *et al.*, 2004).

### III.2 LITHOGRAPHIE

La photolithographie constitue la première étape du procédé de fabrication d'un microsystème. Elle consiste à transférer le motif d'un masque sur le support de la microstructure (substrat). Pour cela, une couche de résine photosensible (photoresist) est déposée sur le substrat, plus généralement à l'aide d'une tournette (*spin coating*). Cette résine est ensuite exposée à des rayonnements UV à travers le masque permettant la reproduction du motif sur le substrat. L'exposition de la résine au rayonnement lumineux change la nature chimique de la résine, la rendant soluble (résine « positive » - dissolution de la résine exposée) ou insoluble (résine « négative » - dissolution de la résine non exposée) au développeur (bain révélateur) (Judy, 2001; Charlot, 2002; Beeby, 2004).

Dans le cas d'une sous exposition des résines, des particules restent sur la surface du substrat après l'attaque chimique, l'ombre du masque risque de ne pas se reproduire exactement sur la

résine. Dans le cas d'une surexposition, la lumière diffusée insolera une plus grande surface de la résine et la partie attaquée chimiquement aura des dimensions différentes de celles prévues (plus importante pour une résine positive, plus faible pour une résine négative).

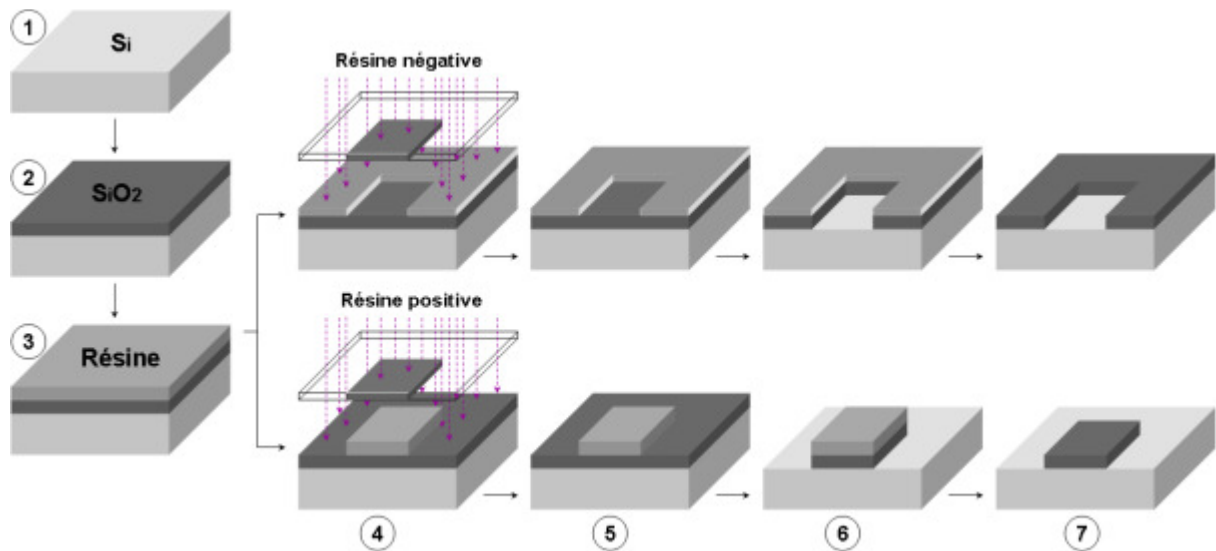


Figure I-17 : Schématisation des différentes étapes de lithographie (modifié de(Charlot, 2002)

La photolithographie est un procédé en plusieurs étapes dont un exemple de schématisation est proposé ci-dessus (Figure I-17). Sur un wafer de silicium (1), une couche d'oxyde ou de métal suivant les besoins va être déposée (2 - oxydation dans notre exemple). La surface pourra ensuite être nettoyée ou asséchée avant l'application de la résine photosensible (3). Un recuit peut-être réalisé pour éviter un écoulement pendant l'exposition aux rayons UV à travers le masque (4). L'étape de développement (5) permet ensuite de dissoudre la partie polymérisée et de conserver les parties non polymérisées par les UV de la résine dans un bain révélateur. Le temps de développement est également important. Un sous-développement risque de ne pas permettre l'apparition de petits motifs alors qu'un surdéveloppement risque de ronger des parties de résine non polymérisée. Une inspection visuelle, et un recuit peuvent ensuite être réalisés pour durcir la résine afin de la rendre plus résistante à l'attaque chimique. L'attaque chimique permet ensuite d'enlever la partie de la couche d'oxyde ou de métal non protégée par la résine (6) avant d'enlever la partie restante de résine avec un acide ou un solvant organique (7).

Pour attaquer l'oxyde de silicium, l'acide fluorhydrique est utilisé. Pour le nitrure  $\text{Si}_3\text{N}_4$ , l'acide phosphorique est utilisé. Dans le cas d'un dépôt d'aluminium, l'acide phosphorique, l'acide acétique, l'acide nitrique sont utilisés. La durée de l'attaque chimique de la couche d'oxyde ou de métal est importante pour les mêmes raisons que celle de l'exposition à la lumière. Une trop longue durée de l'attaque chimique induit une attaque de l'oxyde sous la résine (Judy, 2001; Beeby, 2004).

### III.3 PROCEDES DE MICRO-USINAGE

La réalisation de microsysteme nécessite d'ajouter ou supprimer de la matière par la réalisation d'étapes successives de dépôts de couches ou d'étapes de gravure du substrat afin de créer des structures 2D ou 3D. Deux méthodes de micro-usinage peuvent alors être distinguées, le micro-usinage de volume (*bulk micromachining*) et le micro-usinage de surface (*surface micromachining*).



Le micro-usinage de volume utilise des techniques de gravure qui, avec des couches minces de masquage et des couches d'arrêt, permettent de fabriquer des microstructures à partir du substrat de silicium. L'utilisation du terme « *volume* » provient du fait que la structure est gravée dans le volume du substrat.

Le micro-usinage de surface utilise des dépôts de couches dites « sacrificielles » qui sont entièrement gravées à la fin du procédé pour former les structures. L'utilisation du terme « *surface* » provient du fait que la structure se développe à la surface du substrat utilisé comme support, et n'attaque donc pas le silicium du substrat (Köhler, 1999; Charlot, 2002).

Suite à l'étape de lithographie, le substrat est donc en partie recouvert d'une couche d'oxyde qui va protéger les parties non-gravées lors du processus de gravure. En effet, cette couche protectrice ne sera pas gravée, ou beaucoup moins que le substrat. Plusieurs méthodes de gravure existent et peuvent être classées en deux familles, les gravures « *humides* » (attaque chimique en solution), et les gravures « *sèches* » (attaque par une espèce ionique contenue dans un gaz ou un plasma).

On dispose aujourd'hui de nombreuses données sur les vitesses de gravure dans différentes conditions, autorisant le contrôle de la géométrie de l'objet gravé. Ces méthodes de gravure permettent également d'obtenir des géométries « *isotropes* » (gravure progresse de manière équivalente (ou presque) dans toutes les directions à partir du point d'attaque) ou « *anisotrope* » (gravure progresse suivant une direction bien définie) (Judy, 2001; Menz *et al.*, 2001; Charlot, 2002; Beeby, 2004).

### III.3.A Gravure humide

Ce type de gravure consiste donc à soumettre le wafer à une attaque chimique en solution. L'arrêt de la gravure se fait par rinçage dans la plupart des cas ou atteinte d'une couche « barrière ».

Pour la réalisation de *gravure isotrope humide* du silicium, les solutions employées sont des acides (mélange d'acide nitrique, d'acide fluorhydrique et d'eau). La gravure progressant dans toutes les directions de l'espace, cette méthode permet d'obtenir des cavités sphériques. Les attaques isotropes sont surtout utilisées pour la réalisation de structures suspendues ou en porte à faux par suppression d'une couche sous-jacente de nature différente (Courjon et Bainier, 2001; Charlot, 2002; Permuy *et al.*, 2004).

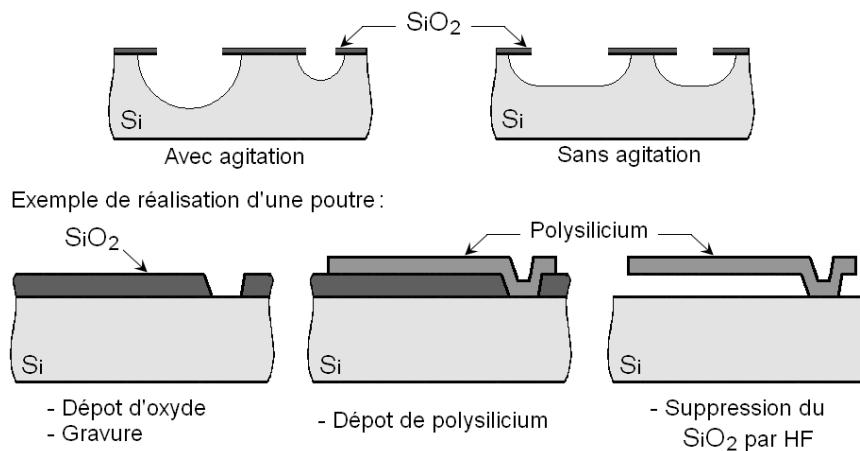


Figure I-18 : Profils de gravure envisageables par gravure humide isotrope

Contrairement à la gravure isotrope qui utilise des solutions acides, la *gravure anisotrope humide* peut être obtenue en utilisant des solutions alcalines de forte concentration telles que



KOH (hydroxyde de potassium), NaOH (hydroxyde de sodium) ou EDP (Ethylène Diamine Pyrocatechol). Dans ce cas, le processus de gravure est contrôlé par l'orientation cristallographique des surfaces du silicium. Pour des raisons encore mal connues, les plans (111), qui comportent une forte densité d'atomes, sont gravés beaucoup plus lentement (environ 100 fois moins vite) que les plans (100). L'anisotropie de la gravure permet de réaliser des attaques profondes avec une bonne maîtrise des dimensions latérales, pour des plaquettes (100), des structures en V ou à fond plat sont ainsi obtenues. Dans le cas de substrats (110), les plans (111) sont orthogonaux à la surface et la réalisation de tranchées ou de murs est donc possible (Figure I-19) (Permuy *et al.*, 2004).

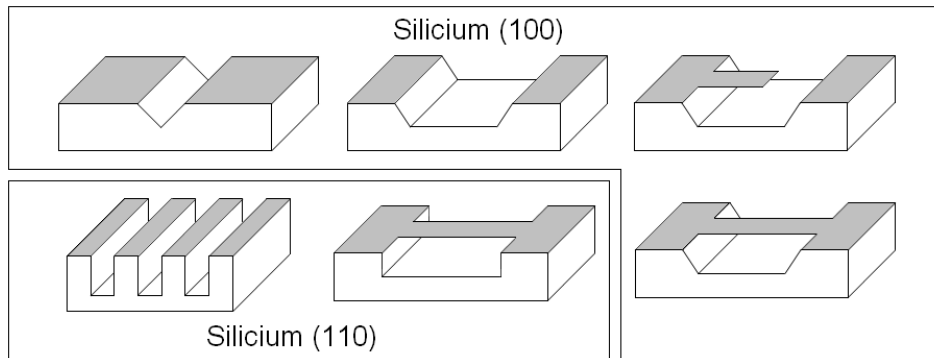


Figure I-19 : Structures envisageables par gravure humide anisotrope

### III.3.B Gravure sèche

Une gravure sèche est le résultat d'une attaque du wafer par une espèce ionique contenue dans un gaz ou un plasma. Suivant les conditions de gravure, tout comme pour les gravures humides, les profils obtenus sont isotropes ou anisotropes. Cependant, pour ce type de gravure, l'anisotropie est contrôlée par le système et non par la structure cristalline du substrat (Judy, 2001; Menz *et al.*, 2001; Charlot, 2002; Beeby, 2004). Quatre types de gravure sèche peuvent être distingués et dépendent de la nature du plasma utilisé :

**Gravure physique** : Dans une chambre à vide, un gaz est introduit qui sous un fort champ électrique de type radiofréquence appliqué entre deux électrodes, génère un plasma (gaz en partie ionisé). Le substrat (en partie recouvert d'une couche protectrice) est placé sur une des deux électrodes, les ions accélérés par le champ électrique, bombardant la surface du substrat. La gravure est réalisée par l'action physique du flux d'ions sur le substrat et conduit à une gravure anisotrope. La pulvérisation est en général réalisée à basse pression pour éviter que la matière soit redéposée.

**Gravure chimique** : Le substrat est en contact avec des composés réactifs contenus dans un gaz. Ces composés migrent vers la surface du substrat sous l'action d'un champ électrique, et développent des réactions chimiques avec la surface du substrat. Ces réactions produisent des composés volatils et forment des trous dans le matériau. La gravure du silicium est isotrope.

**Gravure physico-chimique ou RIE (Reactive Ion Etching)** : Ce type de gravure utilise la combinaison des deux actions précédentes. La RIE est avant tout une gravure physique à laquelle on rajoute un aspect chimique, pour cumuler les avantages des deux techniques. La mise en œuvre est similaire à la gravure physique, avec la génération d'un plasma dans un champ électrique sous basse pression qui grave *physiquement* le wafer par l'impact des ions accélérés sur le matériau réalisant une gravure anisotrope, mais également *chimiquement* par

une réaction entre le gaz ionisé et la surface du matériau (gravure isotrope). La combinaison de ces deux actions permet d'obtenir des flancs de gravure verticaux.

La nature du matériau attaqué et des gaz utilisés ( $\text{SF}_6$ ,  $\text{CHF}_3$ ,  $\text{CCl}_4$  ...), la pression dans l'enceinte et la puissance haute fréquence déterminent le taux d'anisotropie et la vitesse de gravure. Pour du  $\text{SF}_6$ , une pression de 0,1 Pa et une puissance de l'ordre de  $1 \text{ W/cm}^2$  de surface d'électrode, l'attaque du silicium est quasi isotrope et de l'ordre de  $1 \mu\text{m/min}$ . A  $10^{-2}$  Pa, la gravure devient fortement anisotrope, l'effet physique abrasif prédomine, et la vitesse d'attaque est de  $0,1 \mu\text{m/min}$  (Charlot, 2002; Permuy *et al.*, 2004).

**Gravure physico-chimique avec inhibiteur :** Cette technique, fréquemment utilisée dans les technologies de fabrication de microsystèmes, est une modification du mode de fonctionnement de la RIE. En effet, le dispositif est le même que celui utilisé en RIE mais un second gaz est injecté périodiquement dans la chambre de réaction, dont la fonction est de déposer un film inhibiteur (polymère). Ce processus consiste donc à déposer une couche protectrice le long des flancs des cavités gravées, pendant que le fond est attaqué chimiquement et physiquement. Ce type de procédé permet de réaliser des gravures anisotropes profondes à fort rapport d'aspect ( $30 : 1 - 30\mu\text{m}$  de profondeur pour  $1\mu\text{m}$  de différence d'épaisseur entre le haut et le bas) d'où son nom de « Deep-RIE ». La DRIE se caractérise par une haute densité de plasma, une faible pression lors du procédé, une vitesse de gravure élevée et une belle uniformité de gravure (Fu *et al.*, 2009).

Les profils pouvant être obtenus avec ces différents procédés de gravure sèche sont représentés ci-dessous (Figure I-20) :

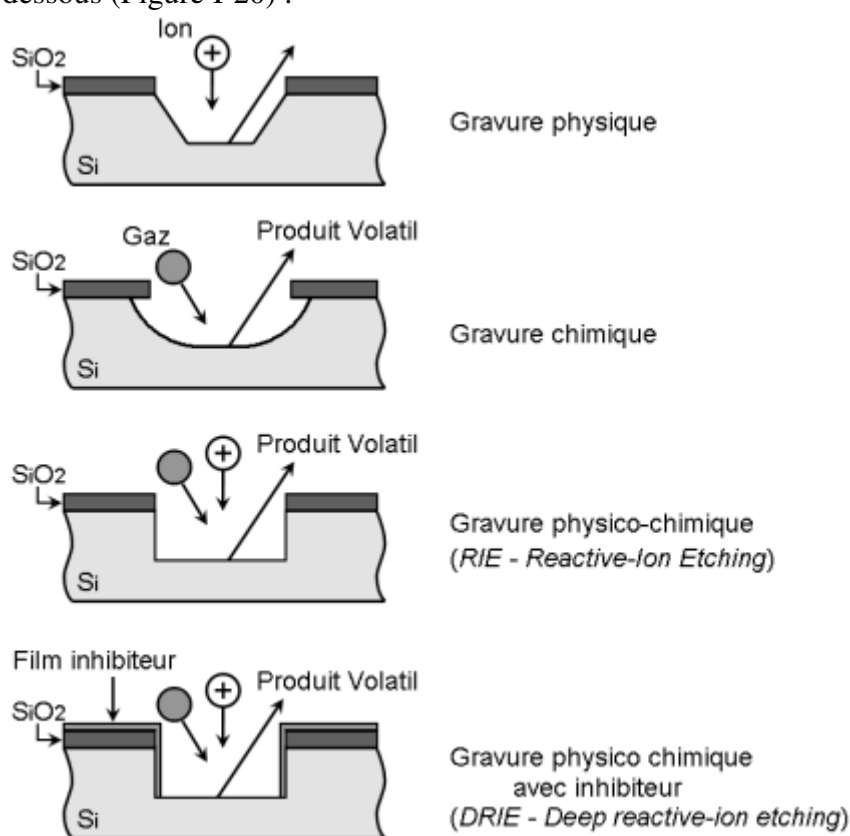


Figure I-20 : Profils de gravure envisageables par gravure sèche

### III.4 TECHNIQUES DE « COLLAGES »

Dans le livre de S. Mir, Charlot explique les technique de « collage » permettant d'obtenir des cavités closes (Charlot, 2002).

Le « collage » entre wafer (« *wafer bonding* ») est une technique qui permet de souder ensemble des substrats de silicium ou de matériaux différents (tel que le verre) afin d'obtenir des structures 3D pouvant former des cavités closes. Les deux techniques les plus utilisés sont la soudure anodique et la soudure par fusion. Dans les deux cas, l'opération se déroule en trois phases, la préparation de la surface, la mise en contact sous pression et enfin le recuit. La qualité du collage dépend énormément de la qualité de la surface, une particule de 1 $\mu$ m peut par exemple créer une zone de non contact de 1cm de diamètre.

#### III.4.A Soudure anodique silicium-verre

Un substrat de verre contenant une grande concentration de métaux alcalins, comme le pyrex par exemple, est maintenue contre le substrat de silicium et porté en température (de 180°C à 500°C). A ces températures, le verre devient légèrement conducteur. Un champ électrique de 200 à 1500 V est alors appliqué à l'ensemble. Les ions positifs (Na<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup>) migrent et créent une zone de déplétion dans le verre proche du silicium. La différence de potentiel dans cette région crée un champ intense qui pousse les plaques en contact intime. L'oxygène du verre est alors transporté vers la jonction et forme une fine couche de SiO<sub>2</sub> qui soude les matériaux. Une soudure extrêmement forte entre les 2 matériaux est alors créée. La soudure entre deux plaques de silicium peut être réalisée par insertion d'un « joint » en verre entre les deux plaques ou par soudure directe par fusion.

#### III.4.B Soudure par fusion silicium-silicium

Le collage direct par fusion est opéré en mettant en contact deux wafers de silicium dont les surfaces ont été préalablement rendues hydrophobes ou hydrophiles et en leur faisant subir une étape de recuit à haute température (1000°C). La mise sous pression mécanique se fait en incorporant des « espaceurs » à la périphérie des wafers de manière à ce que le contact se fasse par le centre. Les espaceurs sont ensuite retirés ce qui crée la propagation d'une onde et la propagation d'un front de collage vers l'extérieur et empêche l'emprisonnement de poches de gaz et la création de bulles. La phase de recuit permet à de nombreux processus chimiques de se dérouler à l'interface comme notamment la création de liaisons Si-O-Si.

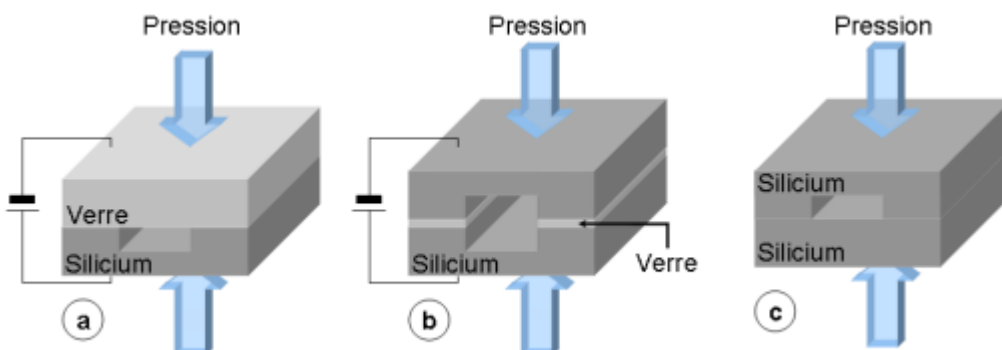


Figure I-21 : Schéma des différentes possibilités de collage : soudure anodique (a) et (b), soudure par fusion (c) (Charlot, 2002)

## **CHAPITRE II : RECHERCHE DES COUCHES SENSIBLES DEDIEES A LA DETECTION DE COV D'ORIGINE FONGIQUE**

A ce jour, les techniques préconisées pour détecter la présence de moisissures dans les environnements intérieurs reposent sur la reconnaissance visuelle d'un développement fongique et la mise en culture de conidies prélevées dans l'air ou sur les surfaces. Or, la présence de ces microorganismes peut se révéler difficile à diagnostiquer, quand, par exemple, les contaminations se situent au niveau du système de ventilation ou encore dans les structures du bâtiment. Invisibles alors à la surface des produits de construction, et indécélables par l'analyse microbiologique de l'air, les moisissures produisent néanmoins, en continu, des métabolites et produits de dégradation inhalables et responsables dans certains cas de maladies (effets cancérigènes de certaines mycotoxines).

La croissance fongique s'accompagne de l'émission de COV. Certains de ces composés peuvent être utilisés comme traceurs de la croissance fongique. Cette méthode simple et peu onéreuse par rapport aux méthodes culturales permet d'obtenir une réponse en quelques jours en ce qui concerne la présence ou non d'un développement fongique dans la pièce investiguée. Les COV étant volatils, ils ne sont pas retenus par les matériaux poreux, par conséquent, contrairement aux méthodes usuelles, l'identification de traceurs chimiques spécifiques permet la détection d'une contamination quand d'autres signes ne sont pas visibles. De plus, l'émission de COV spécifiques débute dès le début du développement fongique. Par conséquent et contrairement à la reconnaissance visuelle, cette mesure présente également l'avantage de permettre de détecter un développement fongique récent.

Les limites actuelles de cette technique, vis-à-vis de la détection de développements fongiques dans les environnements intérieurs, restent liées à la métrologie associée. L'analyse des COV spécifiques nécessite un passage en chaîne GC/MS qui implique l'obtention des résultats sous quelques jours. Ce délai n'est pas compatible avec une stratégie de surveillance des environnements intérieurs. Il apparaît donc nécessaire, dans un objectif de surveillance, de développer de nouvelles métrologies permettant une détection rapide de développements fongiques dans ces environnements.

Aujourd'hui, les progrès dans le domaine de l'électronique, et plus particulièrement de la micro-électronique, permettent d'envisager le développement d'un système d'analyse de taille réduite dédié à la détection des développements fongiques. Plusieurs recherches montrent un intérêt croissant pour le développement de systèmes à base de capteurs pour compléter les méthodes d'analyses existantes.

Malgré la maîtrise des procédés de fabrication, la sélectivité des couches sensibles des différentes technologies de capteurs reste insuffisante pour la détection d'un composé dans un mélange complexe. Des études s'appuient sur le développement de matrices de capteurs afin d'accroître l'information et ainsi améliorer la réponse globale des capteurs par la définition d'une empreinte caractéristique du stimulus. Les améliorations dans les technologies de fabrication des capteurs ainsi que l'utilisation de protocole précis augmentent le potentiel d'utilisation des systèmes multi-capteurs comme outils analytiques. Cependant, une approche multi-capteurs dans une matrice nécessite le traitement d'un grand nombre de données et l'extraction rapide de l'information.

La première phase de cette partie de l'étude consiste donc à rechercher des couches sensibles aux COV d'origine fongique pour les capteurs chimiques composant le module de détection du système d'analyse. Ainsi, de part leurs modularités, leurs relatives simplicités de mise en œuvre et leurs fonctionnements à température ambiante, des capteurs polymères ont été développés afin de différencier *in vitro* diverses ambiances (chambres d'émissions contenant des standards chimiques ou des souches fongiques).

## I METHODES EXPERIMENTALES

### I.1 DISPOSITIF EXPERIMENTAL POUR CAPTEURS POLYMERES

#### I.1.A Système d'acquisition de données

Les expérimentations ont été réalisées à partir d'un système permettant l'acquisition de signaux issus d'une carte composée de polymères conducteurs constituant le cœur du système.

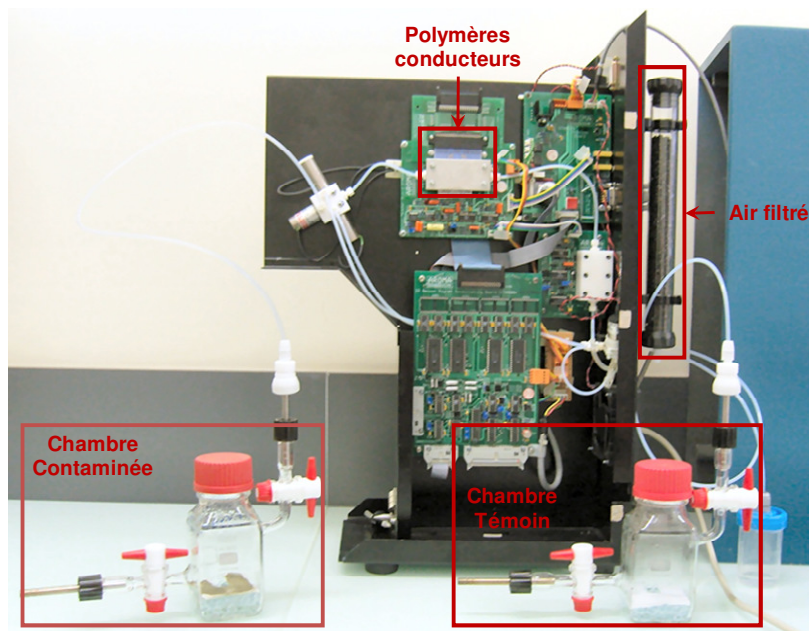


Figure II-1 : Photographie du système d'acquisition

Les chambres d'émissions sont placées en dehors du système. Un système de filtration composé d'un tube TENAX est situé en amont de la chambre d'émission et assure un renouvellement d'air « propre » (fuite). En aval, un tube en PTFE permet la connexion entre la chambre d'émission et une électrovanne 3 voies. L'ensemble des raccords est également en PTFE. L'électrovanne 3 voies (BIO-CHEM-VALVE CORP) permet de sélectionner une voie de référence (air filtré sur charbon actif), une voie d'échantillonnage (chambre d'émission) ou une voie de nettoyage (mélange 1-butanol / eau).

Une pompe (ESCAP) permet de transférer l'air de différentes ambiances à  $147 \pm 1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  vers la matrice de capteurs confinée dans une chambre PTFE (20x25x5mm de dimensions intérieures soit un volume total de 2,5ml).

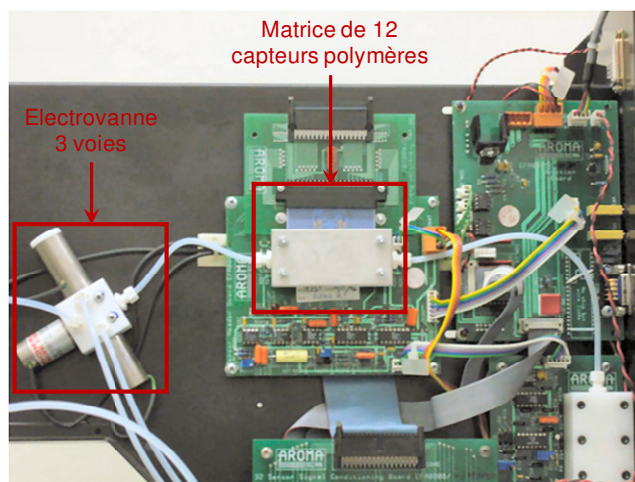


Figure II-2 : Photographie de l'électrovanne et de la chambre PTFE

Une carte adaptée à ce système a ainsi été réalisée spécifiquement pour cette étude. Cette carte est constituée de 12 paires d'électrodes en or (avec une couche d'accroche en chrome) déposées sur un wafer en verre (Figure II-3).

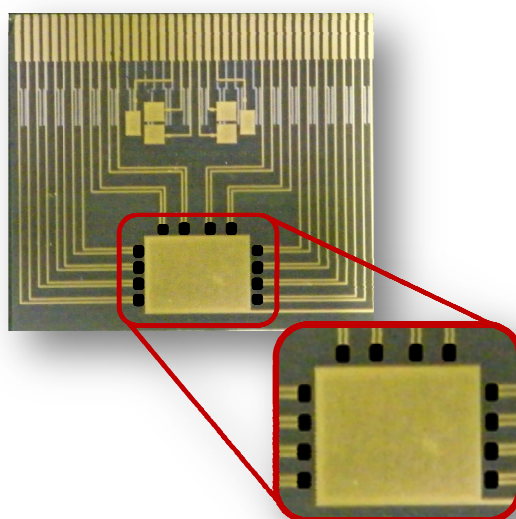


Figure II-3 : Photographie de la matrice de capteurs polymères

Des polymères sont ensuite déposés entre chaque paire d'électrodes par électropolymérisation ou par drop-coating (dépôt d'une goutte pour les polymères en solution).

Le système est commandé aux cours du temps. Il permet d'observer l'évolution de la résistivité des capteurs ( $R_{sample}$ ), ainsi que de récupérer informatiquement ces données pour les traiter. De l'air filtré sur charbon actif, est placé en référence afin de déterminer la ligne de base ( $R_{référence}$ ). Un mélange 1-butanol / eau (1/50 ; v/v) permet le nettoyage complet des capteurs suite à une exposition à une chambre d'émission. En effet, ce mélange permet de saturer le capteur tout en permettant un retour rapide à la ligne de base.

Les résultats sont présentés sous forme de différences fractionnelles de résistances :

$$\% \frac{dR}{R} = \frac{(R_{sample} - R_{référence})}{R_{référence}} \times 100$$

### I.1.B Dépôt de couche polymères

Les polymères conducteurs peuvent être synthétisés à partir d'une large gamme de monomères dans divers solvants en présence d'un grand nombre de contre-ions. Les expérimentations ont donc consisté à déposer différents polymères conducteurs, dopés avec différents contre-ions ainsi que des mélanges de ces polymères, sur les électrodes de la matrice du système.

Les polymères en solution ont été déposés à l'aide d'un cône de micropipette. Les polymères disponibles sous forme de poudre ont été solubilisés dans du chloroforme puis déposés également à l'aide d'un cône de micropipette. Ces polymères en solution ont ensuite été dopés avec des vapeurs de diiode ( $I_2$ ) pendant 2 heures. Le PEDOT-PSS est un polymère en solution aqueuse déjà conducteur et n'a donc pas besoin d'être dopé avec les vapeurs de diiode.

Le dépôt des polymères insolubles se fait par électropolymérisation jusqu'à percolation (jonction de polymère entre les deux électrodes) à l'aide d'un montage à 3 électrodes et de la solution de monomère (concentration de  $0.05 \text{ mol.L}^{-1}$ ) avec un électrolyte (concentration de  $0.1 \text{ mol.L}^{-1}$ ).

Des essais ont été réalisés à partir de polymères conducteurs développés par le LPPI (Laboratoire de Physico-chimie des Polymères et des Interfaces). La liste des polymères ainsi que les mélanges (superposition de différentes couches) utilisés pour la distinction d'environnements non-contaminés et contaminés est présentée dans le Tableau II-1.

Tableau II-1 : Liste des polymères conducteurs testés

Polymère en solution	
Poly(éthylènedioxythiophène)-poly(styrènesulfonate) (PEDOT-PSS)	
Polymères en solution (dopés par $I_2$ )	
Polymères seuls	Mélanges de polymères
Poly (biFluorène-EDOT-Carbazole)	PEDOT-PSS + Poly (biFI-EDOT-Cz)
Poly (4-fluorophényl) thiophène	PEDOT-PSS + Poly (4-fluorophényl) thiophène
Copolymère (biFluorène-EDOT-Carbazole) (COPO (biFI-EDOT-Cz))	PEDOT-PSS + COPO (biFI-EDOT-Cz)
Poly (EDOT-di-Cz)	PEDOT-PSS + Poly (EDOT-di-Cz)
Poly(3-hexylthiophène) (P3HT)	PEDOT-PSS + P3HT
Polymères électrodéposés	
Polymères seuls	
Polypyrrole + perchlorate de lithium	
Polypyrrole + para-toluène sulfonate de sodium	
PEDOT + perchlorate de lithium	

La sélectivité et la sensibilité des polymères conducteurs dépendent de leurs morphologies. Ainsi, la morphologie de ces polymères peut être modifiée par différents paramètres tels que la nature des contre-ions, leurs concentrations, la densité de courant de polymérisation, la nature de la chaîne, la nature des groupements terminaux ou encore par l'ajout de chaîne latérale.



## I.2 MATERIEL CHIMIQUE ET BIOLOGIQUE

Dans un premier temps, des standards identifiés comme traceurs d'un développement fongique, d'après l'étude de Moularat *et al.* (2008c), ont été utilisés. Dans un second temps, cinq espèces fongiques et un basidiomycète ont été sélectionnés en fonction de leurs spécificités liées à différents types d'environnements intérieurs.

### I.2.A Matériel chimique

Les COV d'origine fongique étant émis en faible concentration par les moisissures, les premiers essais sur les capteurs ont été réalisés à partir de standards. Parmi les composés identifiés comme traceurs d'un développement fongique, trois ont été sélectionnés de part leurs appartenances à une famille chimique (alcool, cétone, molécule cyclique).

La liste de ces standards (SIGMA-ALDRICH) est décrite dans le Tableau II-2.

Tableau II-2 : Liste des standards pour les essais avec les capteurs polymères

Composé	Famille chimique	Pureté (%)
2-méthyl-1-butanol	alcool	99
2-méthylfurane	cétone + molécule cyclique	99
1-octèn-3-ol	alcool + alcène	99

Le 2-méthyl-1-butanol et le 2-méthylfurane sont des traceurs spécifiques du vivant et le 1-octèn-3-ol est émis par toutes les moisissures.

### I.2.B Matériel biologique

La sélection de six micromycètes spécifiques à trois types d'environnements intérieurs et d'un basidiomycète dont le support de croissance est le bois, permet de générer une base de travail représentative des environnements intérieurs.

Trois de ces souches sont issues de la collection de l'institut d'hygiène et d'épidémiologie de Bruxelles - section mycologie (IHEM), et quatre sont des souches sauvages isolées à partir de matériaux contaminés prélevées *in situ* et identifiées par le LRMH :

- Deux souches fréquemment rencontrées dans l'habitat, *Aspergillus versicolor* (IHEM 18884), et *Penicillium brevicompactum* (IHEM 04891),
- Deux souches fréquemment rencontrées dans les musées ou expositions, *Penicillium solitum* (isolé par le LRMH sur du lin et identifié par le MNHN) et *Penicillium corylophilum* (isolé par le LRMH sur de la colle peau de lapin et identifié par le MNHN),
- Une souche rencontrée dans les environnements intérieurs et émettrice de nombreux COV, *Aspergillus niger* (IHEM 05077)
- Une souche ayant colonisé les grottes de Lascaux, *Fusarium solani* (isolé par le LRMH sur de l'argile),
- Un basidiomycète caractéristique de la dégradation des lignines de bois feuillu, *Phellinus megaloporus* (isolé par le LRMH sur du hêtre).

Ces souches, comme précédemment, ont été repiquées sur milieu de culture S10 (3g de bouillon de Sabouraud glucosé à 2 % dilué, 20 g d'agar, 1g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g MgSO<sub>4</sub> et 1 L d'eau ultra pure). Elles sont ensuite incubées pendant 7 jours à 25°C à l'obscurité (étuve Incucell, Fisher Bioblock). Des échantillons sont alors conservés à 4°C à l'obscurité durant 3 mois dans 1 mL d'eau ultra pure filtrée.



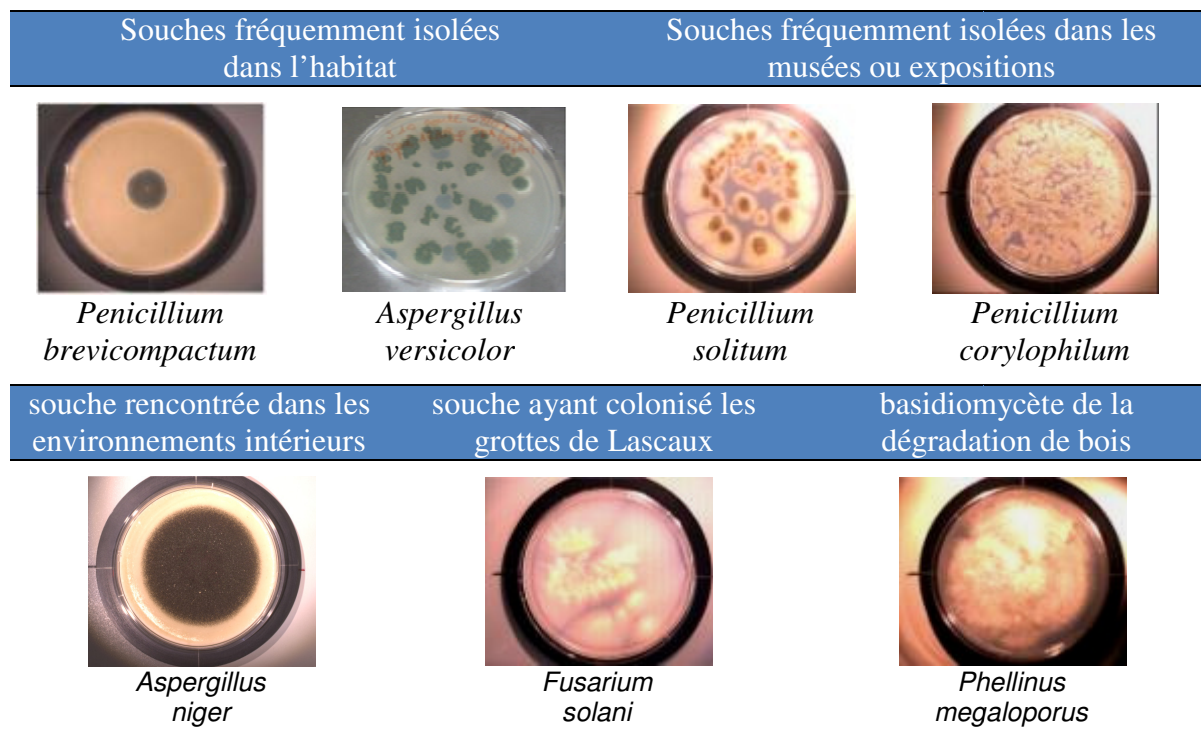


Figure II-4 : Photographies des souches de l'étude cultivant sur milieu S10 (après 7 jours d'incubation à 25°C)

Avant de procéder à une contamination, deux subcultures sont nécessaires. La première est réalisée sur milieu S10 qui constitue un milieu pauvre : 7 jours d'incubation à 25°C à l'obscurité (étuve Incucell, Fisher Bioblock). La seconde est obtenue sur milieu à base d'avoine et d'agar (Oatmeal-Agar : 60 g d'avoine (Celnat), 12,5 g d'agar et 1 L d'eau ultra pure) dans des conditions d'incubation identiques.

### I.3 CHAMBRES D'ÉMISSIONS ET SUPPORTS DE CROISSANCE

#### I.3.A Chambres d'émissions contenant des standards chimiques

Les chambres d'émission utilisées pour étudier les réponses à des standards sont identiques à celles utilisées pour l'identification des traceurs (chambre en verre et PTFE de 300 mL). Dans un premier temps, 4 chambres contenant chacune trois supports en fibre de verre de 2 cm × 5 cm ont été utilisées. Dans 3 de ces chambres, un des traceurs a été injecté, la dernière chambre étant conservée comme témoin. L'équilibre de l'humidité relative et de la température étant retrouvé en 30 min, une seule chambre témoin a été suffisante.

Dans un deuxième temps, souhaitant comprendre le mécanisme d'interaction entre la molécule cible et le polymère en l'absence d'humidité, des chambres sans support ont été préparées. Les procédés de stérilisation et d'injection de traceurs dans les chambres sont décrits en Annexe V.

#### I.3.B Chambres d'émissions contenant des souches fongiques

Les chambres d'émission utilisées pour générer les ambiances contaminées ou témoins sont identiques à celles utilisées pour l'identification des traceurs (chambre en verre et PTFE de 300 mL). Chaque chambre contient trois supports en fibre de verre de 2 cm × 5 cm pour l'étude des 5 moisissures ou 1 morceau d'hêtre de 1,5 cm × 1,2 cm × 5 cm pour le

basidiomycète. Pour chaque chambre contenant un support contaminé (échantillon), une chambre avec un support stérile (témoin) est associée.

Dans un premier temps, la création de différents environnements expérimentaux a été réalisée dans les chambres avec un matériau non émissif, la fibre de verre. Douze chambres ont ainsi été créées dont six conservées comme environnement témoin donc non contaminées. Deux chambres représentatives de l'habitat ont été contaminées, l'une par *A. versicolor* et l'autre par *P. brevicompactum*. Deux chambres représentatives des musées ont été contaminées, l'une par *P. solitum* et l'autre par *P. corylophilum*. La chambre représentative de l'environnement des grottes a été contaminée par *Fusarium solani*. La chambre représentative de la dégradation des lignines de bois fibreux a été contaminée par le basidiomycète *Phellinus megaloporus*. Les procédés de stérilisation et de contamination des supports sont décrits en Annexe VI.

## II CARACTERISATION DES COUCHES SENSIBLES

### II.1 DIFFERENCIATION D'AMBIANCES PAR DES CAPTEURS POLYMERES

#### II.1.A Caractérisation à partir de souches fongiques

Des essais préliminaires, réalisés à partir de différentes souches de l'étude, ont permis d'obtenir des réponses spécifiques de capteurs polymères soumis à des environnements moisiss. L'ensemble des profils obtenus avec les différentes souches (répété 3 fois) montre un comportement différent de la réponse des capteurs entre un environnement contaminé et un environnement stérilisé. Suite à cette observation, une caractérisation plus précise des réponses de capteurs polymères a été réalisée avec deux espèces de moisissures fréquemment rencontrées dans tous types d'environnements intérieurs : *Penicillium brevicompactum* et *Aspergillus niger*.

Le protocole expérimental utilisé pour la caractérisation des réponses consiste à faire passer différents échantillons d'air sur les 12 capteurs polymères présents sur la carte du système pendant 20 min. Parmi les 14 polymères et mélanges de polymères testés (Tableau II-1), 5 montrent un comportement différent du signal en fonction des types d'échantillons (air filtré, chambre témoin, chambre contaminée).

Les capteurs nommés A1 et A2 sont à base de PEDOT-PSS, le capteur B de Polypyrrole + perchlorate de lithium et les capteurs C1 et C2 sont une superposition de PEDOT-PSS et de COPO.

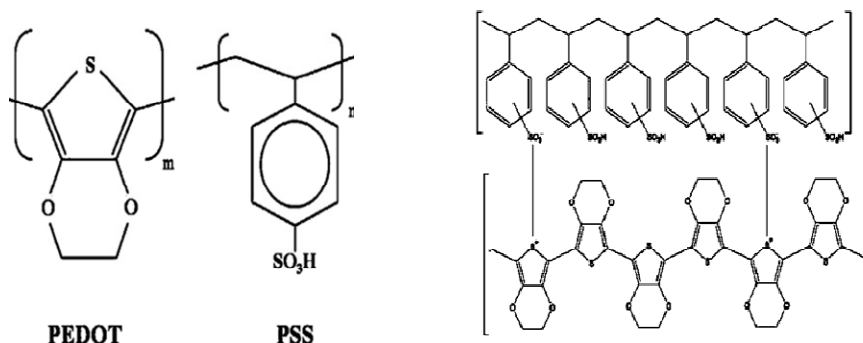


Figure II-5 : Structure chimique du PEDOT-PSS

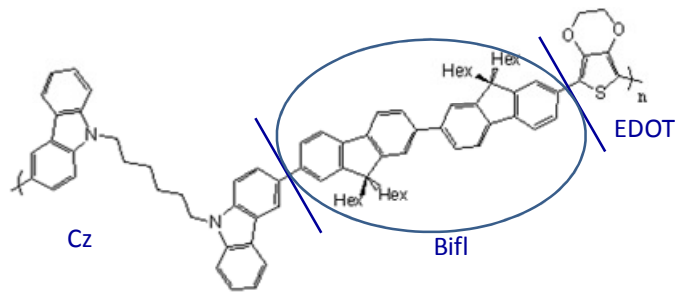


Figure II-6 : Structure chimique du COPO (biFl-EDOT-Cz)

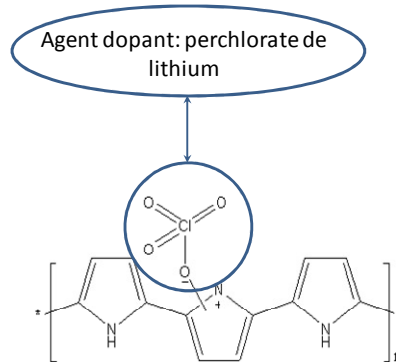


Figure II-7 : Structure chimique du Polypyrrole + perchlorate de lithium

Les autres polymères n'ont montré soit aucune réponse soit des réponses variables non spécifiques des stimuli appliqués.

De l'air filtré sur charbon actif permet d'obtenir un retour à une réponse stable utilisée comme ligne de base pour le prochain échantillon (stérile ou contaminé). Les différences de comportement du signal entre une ambiance témoin et une ambiance contaminée sont alors observés (Figure II-8).

Afin d'assurer la répétabilité, ce protocole a été réalisé cinq fois et des résultats identiques ont été observés. Afin de vérifier que l'ordre de passage n'influence pas le comportement des capteurs (désorption incomplète de la vanne ou d'autres paramètres liés à des ordres de passage), l'ordre de passage des ambiances a également été changé (Figure II-9).

Les Figure II-8 et Figure II-9 présentent les résultats obtenus avec une exposition des capteurs à de l'air prélevé dans des chambres témoins ainsi que dans des chambres contaminées.

Deuxième partie : Recherche des couches sensibles dédiées à la détection de COV fongique

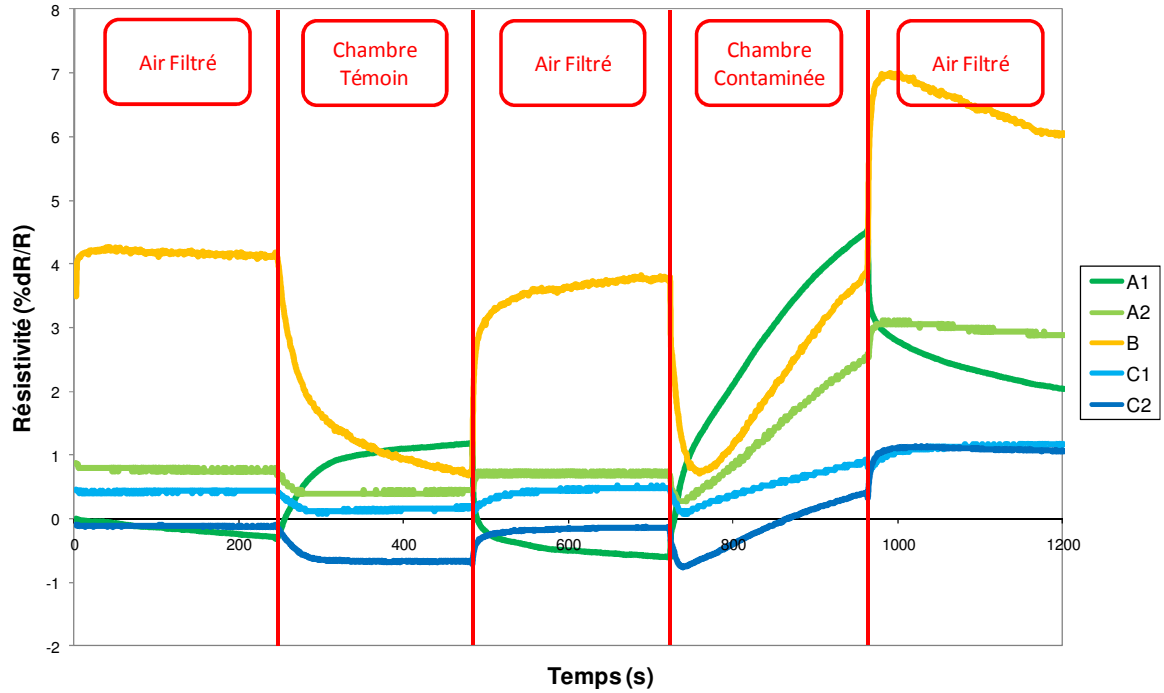


Figure II-8: Comparaison du comportement de capteurs polymère entre ambiances stériles et contaminées

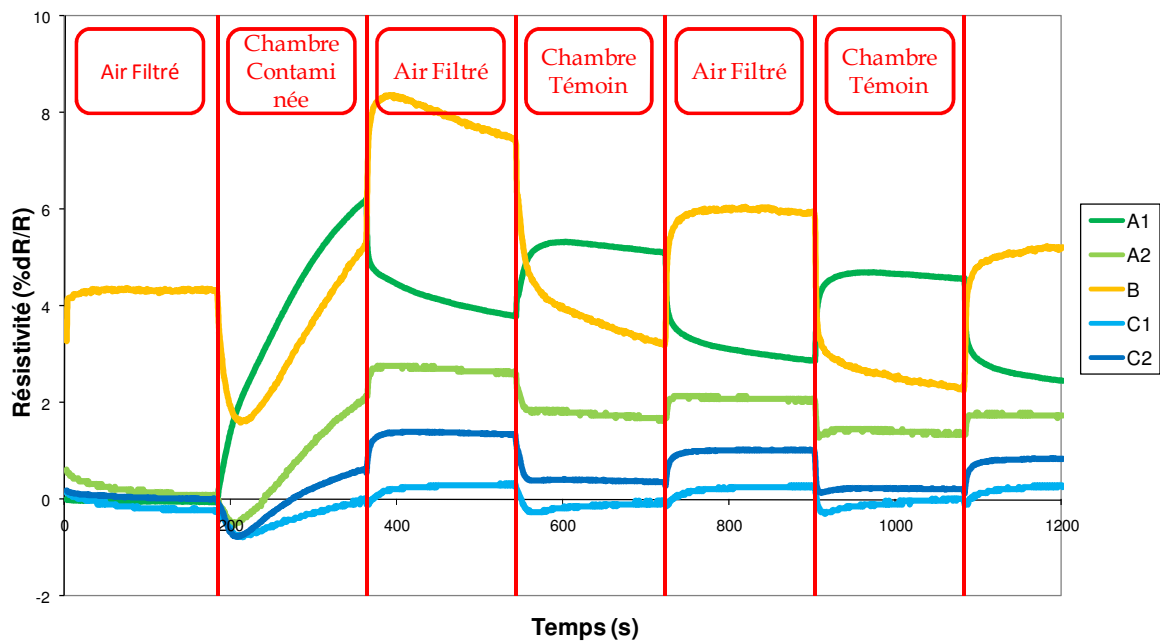


Figure II-9: Comparaison du comportement de capteurs polymère entre ambiances stériles et contaminées

Une dérive de la valeur de la ligne de base est observée durant les phases d'exposition à de l'air filtré après chaque échantillon. Cette dérive peut-être expliquée par l'absence de phase de nettoyage dans ce protocole. Cependant, deux types de comportement peuvent être observés en fonction du type de l'environnement testé (témoin et contaminé) :

- Témoin : la résistance des capteurs se stabilise.
- Contaminé : la résistance des capteurs augmente.

Un protocole de nettoyage permettant une désorption complète des COV adsorbés, doit être réalisé par la suite afin d'éviter cette dérive dans le cas d'une utilisation de ces polymères dans un système de capteurs dédié à la détection des moisissures pour des applications *in situ*.

Durant les différents tests, un phénomène de dilution de l'air contaminé des chambres a également été constaté du fait des prélèvements successifs. Cela permet d'expliquer les variations entre deux prélèvements dans une même chambre.

Pour les capteurs A1 et A2 constitués du même polymère déposé par goutte, le PEDOT-PSS, un comportement identique pourrait être attendu. Or, une superposition des courbes n'est pas observée. Le PEDOT-PSS est une suspension colloïdale : le PEDOT seul étant insoluble, il est polymérisé en présence d'un polyélectrolyte comme l'acide polystyrène sulfonique (PSS) qui favorise sa dispersion dans l'eau. D'une manière générale, un dépôt par goutte implique que deux capteurs avec le même polymère présentent initialement un nombre de molécules différents au sein du film : ils n'ont donc pas le même niveau de gonflement, donc d'épaisseur et par conséquent montrent des réponses variables. Ces paramètres sont donc à contrôler afin d'assurer une répétabilité et une reproductibilité.

La différence de comportement observée avec le polymère B peut-être également expliquée par son mode de dépôt. Dans son cas, il est le seul des 5 polymères à avoir été déposé et dopé électrochimiquement.

Les capteurs C1 et C2 constitués de la superposition de PEDOT-PSS et de COPO présentent un comportement similaire.

Les COV émis par les moisissures sont des molécules polaires (alcool, cétones, composés sulfurés). L'hypothèse émise sur le mécanisme d'interaction serait donc une interaction de ces fonctions polaires avec les atomes d'oxygène (O), de soufre (S) et d'azote (N) présents sur les polymères (voir les structures chimiques présentées en Figure II-5, Figure II-6 et Figure II-7).

Dans les différents essais de mélange de polymère avec le PEDOT-PSS, seule la superposition avec la couche de COPO permet la distinction entre les ambiances. Afin de comprendre le rôle du COPO, des essais ont été réalisés avec une couche de COPO seul non dopé : aucune variation de résistivité n'a été détectée en présence des diverses ambiances. Cela s'explique par le fait que le copolymère non dopé est très peu conducteur.

Des tests ont donc ensuite été réalisés avec le COPO seul dopé pendant 2 heures. Cette condition de dopage est identique à celle utilisée lors des dépôts effectués avec la superposition de PEDOT-PSS et de COPO. Cependant, bien que le temps d'exposition aux vapeurs de diiode soit identique, le taux de dopage lors d'un dopage chimique n'est pas contrôlé.

Les essais réalisés avec le COPO dopé ont donné des réponses variables et non spécifique des stimuli appliqués. Les variations du taux de dopage inhérentes à un dopage chimique, ainsi que la synergie entre la couche de PEDOT-PSS et le COPO peuvent expliquer cette différence de comportement entre l'utilisation du COPO seul et le mélange avec le PEDOT-PSS.

Le poly (EDOT-di-Cz) comprend uniquement deux unités retrouvées dans le COPO, à savoir l'unité EDOT et l'unité dicarbazole. Les essais menés avec ce polymère ne permettent pas la distinction entre les ambiances. Cette observation permet d'écarter l'action potentielle de l'unité dicarbazole dans le mécanisme d'interaction avec les COV.

L'unité EDOT étant retrouvée dans le PEDOT-PSS, des essais ont donc été réalisés à partir de la dernière unité composant le COPO, soit l'unité bifluorène.

Le dopage chimique semble déstabiliser les polymères. En effet, plusieurs réponses instables ont été observées suite à ce type de dopage.

Les premiers essais ont donc été réalisés avec l'unité bifluorène dibromé non dopée aux vapeurs de diiode. Les essais sont réalisés à partir d'une chambre témoin (avec fibre de verre stérile) et une chambre contaminée par *Penicillium brevicompactum*. Cette unité permet d'observer une différence de comportement entre un environnement contaminé et un environnement stérile (Figure II-10).

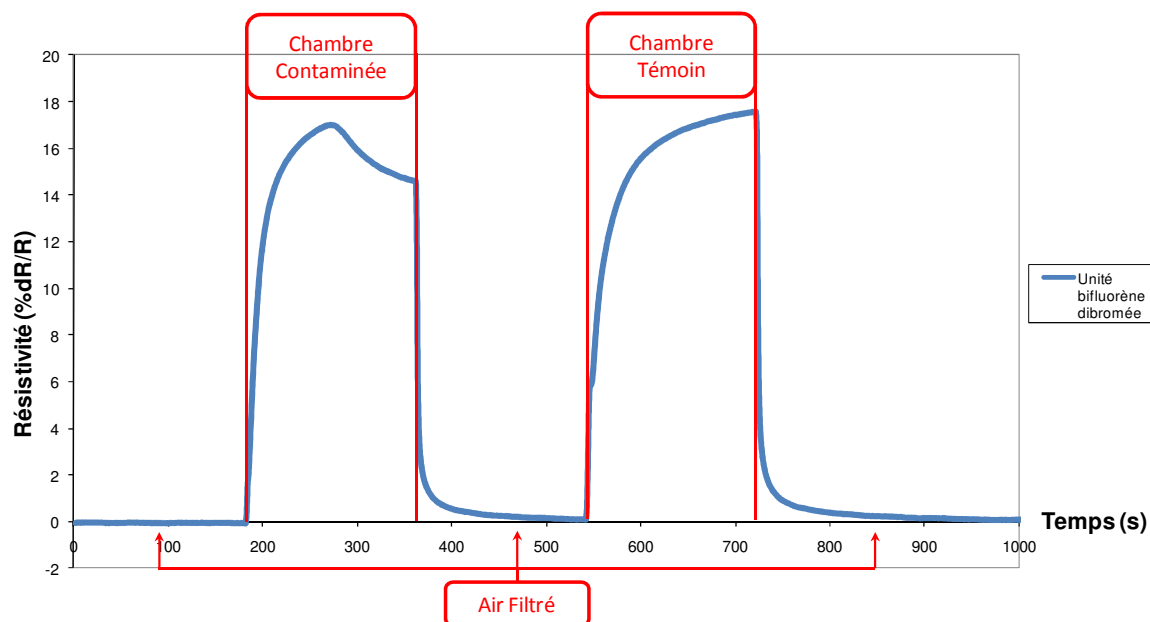


Figure II-10 : Comparaison du comportement de l'unité bifluorène dibromée entre une ambiance stérile et contaminée

Les essais réalisés avec l'unité bifluorène dibromée dopée aux vapeurs de diiode durant 2 heures n'ont eu cependant pas permis d'obtenir de réponse stable pour la différenciation des ambiances.

Suite aux différents essais réalisés à partir de polymère en solution, des différenciations d'ambiances entre un environnement contaminé et un environnement stérile ont pu être obtenus à partir du PEDOT-PSS et de l'unité bifluorène.

Le capteur B (Figure II-8 et Figure II-9) ayant également permis la distinction entre ambiances stérile et contaminées, des essais ont également été menés à partir de polymères électropolymérisés, notamment pour étudier l'influence des contre-ions utilisés lors de ce type de dépôt.

Ainsi, le perchlorate de lithium utilisé comme contre-ion avec le polypyrrole, a été dans un premier temps remplacé par du para-toluène sulfonate de sodium puis, dans un second temps, par de l'octane sulfonate de sodium (Figure II-11).

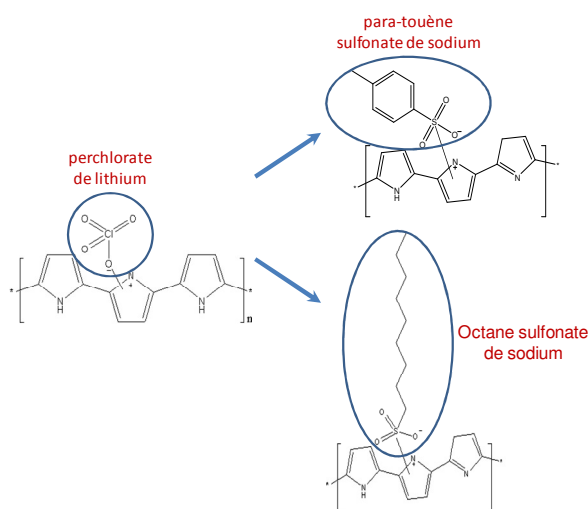


Figure II-11 : Structures chimiques avec modification du contre-ion du polypyrrole

Dans le cas du polypyrrole avec le para-toluène sulfonate de sodium une variation de résistivité est observée, cependant celle-ci est identique pour les deux ambiances (contaminée et stérile). Aucune différenciation n'est donc possible avec ce contre-ion.

En revanche, une différenciation caractéristique entre un environnement stérile et un environnement contaminé est possible à partir du polypyrrole avec l'octane sulfonate de sodium (Figure II-12). Les essais sont réalisés dans une chambre témoin (avec fibre de verre stérile) et une chambre contaminée par *Penicillium brevicompactum*.

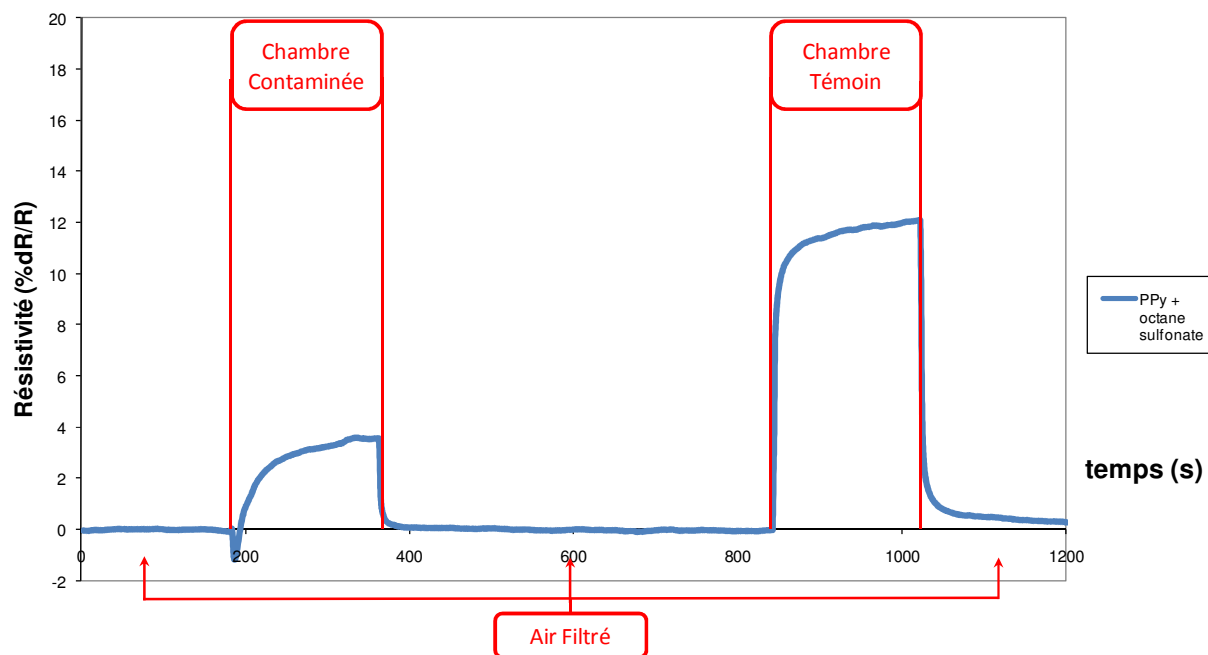


Figure II-12 : Comparaison du comportement du polypyrrole + octane sulfonate entre une ambiance stérile et contaminée

Cette différenciation est caractérisée par la diminution de la variation de résistivité. En effet, une variation plus importante en présence d'une chambre témoin est observée. La présence des COV polaires de la chambre contaminée engendre donc une diminution de la variation.

## Deuxième partie : Recherche des couches sensibles dédiées à la détection de COV fongique

Les essais réalisés à partir du polypyrrole dopé avec différents contre-ions montrent l'influence de la structure chimique de ceux-ci dans le mécanisme d'interaction avec les COV. Si le para-toluène sulfonate de sodium ne permet pas de discriminer les environnements, une distinction est observée avec le perchlorate de lithium et l'octane sulfonate de sodium. Parmi ces deux contre-ions, le plus discriminant est l'octane sulfonate de sodium. Ce dernier présente une chaîne carbonée linéaire similaire à celle retrouvée dans différents COV d'origine fongique.

Ainsi, sur l'ensemble des couches sensibles testées, un monomère, l'unité bifluorène et deux polymères, le PEDOT-PSS et polypyrrole dopé avec l'octane sulfonate de sodium, ont été retenues comme couches sensibles susceptibles de différencier des environnements contaminés d'environnements stériles.

Afin de comparer les réponses entre environnements moisi et non moisi, les différences fractionnelles de résistance ont été mesurées pour chacune des couches. Des analyses de variances (ANOVA – Analysis Of Variance) ont ensuite été réalisées pour chaque couche sensible afin de comparer ces résultats (Tableau II-3). Le seuil de signification est fixé à 0,10.

Tableau II-3 : Analyse de variance des séries de différence fractionnelle de résistance issues d'environnements stériles et contaminés.

	<i>Moyenne</i>		<i>Ecart-type</i>		<i>Valeur test pour F</i>	<i>Valeur critique pour F</i>
	<i>Témoin</i>	<i>Contaminé</i>	<i>Témoin</i>	<i>Contaminé</i>		
Unité Bifluorène dibromé	19,3	15,6	1,8	1,2	6,9	4,5
PEDOT-PSS	6,1	4,2	1,2	0,8	6,1	3,8
Polypyrrole + octane sulfonate	8,9	7,3	0,6	0,7	9,4	4,5

Le rapport statistique montre une différence au moins significative à 90 %, entre la série de données issues de chambres contaminées et celles de chambres non contaminées pour tous les polymères étudiés ( $F_{\text{test}} > F_{\text{critique}}$ ). Les capteurs étudiés permettent ainsi de distinguer les environnements contaminés de ceux non contaminés en laboratoire. Le polypyrrole est ici le polymère le plus discriminant.

De manière générale, la sensibilité obtenue avec les différents polymères est issue de l'interaction entre les fonctions polaires des COV et des polymères. Cependant, cette interaction ne peut expliquer à elle seule les variations de résistivités. En effet, l'unité bifluorène dibromé ne possède pas d'hétéroatomes (O, S ou N) et des variations de résistivité sont tout de même observées. Une hypothèse à partir des essais réalisés avec cette unité est basée sur l'affinité entre les chaînes carbonées linéaires (hexyles du bifluorène) et celles des COV fongiques.

Cette hypothèse est confortée par les observations réalisées lors des essais avec les différents contre-ions du polypyrrole, notamment avec l'octane sulfonate de sodium dont les chaînes carbonées linéaires sont similaires à celles de différents COV fongiques.

Le PEDOT-PSS ne possède pas de chaîne carbonée linéaire mais uniquement des hétéroatomes de type oxygène (O) et soufre (S). Des caractérisations ont donc été réalisées avec le polypyrrole et l'unité bifluorène dibromé à partir de traceurs cibles dans le but de confirmer ce mécanisme d'interaction entre COV et traceurs.



### II.1.B Caractérisation à partir de traceurs cibles

Des tests ont été réalisés avec trois traceurs (2-méthyl-1-butanol, 2-méthylfurane et 1-octène-3-ol) afin d'étudier les interactions entre les polymères conducteurs déposés et les molécules polaires et plus particulièrement à des alcools. Pour cela, trois types d'ambiance ont été conçues, une ambiance contenant uniquement de l'eau, une avec un traceur de type alcool (2-méthyl-1-butanol ou 1-octène-3-ol) et enfin une avec un mélange alcool/eau (1/50 volume/volume).

Les comportements obtenus avec l'unité bifluorène dibromé et le polypyrrole sont présentés respectivement en Figure II-13 et Figure II-14. Ce comportement a été observé lors des dix essais réalisés avec chacun des deux traceurs.

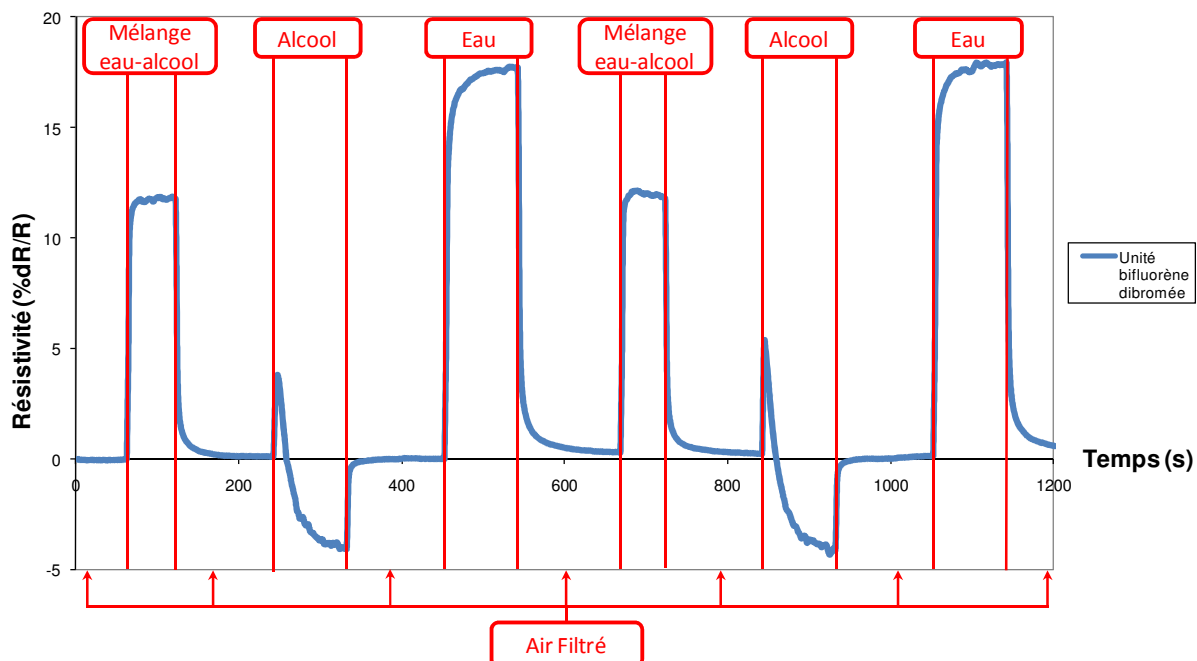


Figure II-13 : Comportement de l'unité bifluorène dibromé en présence d'eau et/ou alcool

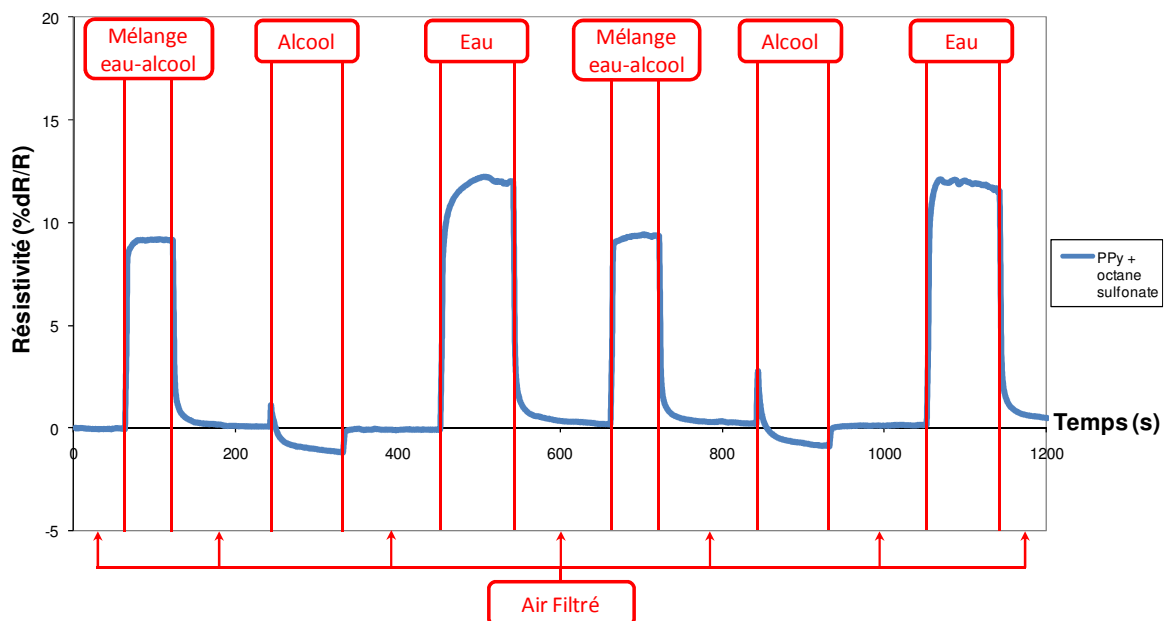


Figure II-14 : Comportement du polypyrrole dopé avec l'octane sulfonate en présence d'eau et/ou alcool

En présence d'alcool pur (2-méthyl-1-butanol ou 1-octène-3-ol), une variation négative est observée. En revanche, en présence d'eau pure, une variation positive est constatée. Ainsi, lorsque le mélange alcool/eau est présenté, une variation positive est détectée. Celle-ci est cependant inférieure à celle obtenue avec l'eau pure (30 % en moyenne sur les dix essais pour l'unité bifluorène dibromé et 25 % pour le Ppy+octane sulfonate).

Etant donné la composition du mélange, cela laisse supposer une adsorption des molécules du traceur (alcool) sur ce monomère et ce polymère. Cette adsorption implique une diminution de la résistivité des couches sensibles. Une compétition entre les fonctions OH de l'eau et des alcools semble se produire au niveau des sites d'adsorption du monomère et du polymère. Ainsi, la variation positive observée au cours des cinq premières secondes lors du passage du traceur s'explique par le fait qu'il contient de l'eau.

### III DISCUSSION SUR LES COUCHES SENSIBLES

L'hypothèse basée sur l'affinité entre les chaînes carbonées linéaires (Hexyles du bifluorène et octyle de l'octane sulfonate) et celles des COV fongiques est validée par les variations caractéristiques obtenues lors de ces essais. En effet, ces variations négatives ne sont pas observées avec les autres polymères comme le PEDOT-PSS et polypyrrole+ perchlorate de lithium qui ne contiennent pas de chaîne carbonée linéaire. La similarité entre les chaînes carbonées linéaires favorise les interactions hydrophobes impliquant donc une attraction entre les chaînes. Cette attraction favorise ainsi le saut de charge entre les chaînes et donc la circulation des électrons impliquant une diminution de la résistivité du film.

Les tests préliminaires réalisés à partir de capteurs polymères laissent penser qu'une détection de moisissures à partir de ces capteurs serait envisageable. Cependant, à l'heure actuelle, les capteurs restent insuffisamment spécifiques pour permettre une utilisation *in situ*. Les capteurs polymères à base d'unité bifluorène dibromé, de PEDOT-PSS et de polypyrrole avec l'octane sulfonate ont permis de différencier des environnements contaminés d'environnements non contaminés.

Cependant, l'unité bifluorène dibromé n'est pas stable dans le temps. En effet, les atomes de brome présents aux 2 extrémités de l'unité bifluorène sont susceptibles de réagir avec d'autres espèces chimiques et donc de modifier l'unité. Au contact des différents environnements, l'unité bifluorène devient instable : des dérives du signal sont observées.

Par ailleurs, les résultats ont montré que l'influence de la teneur en eau de l'échantillon reste un problème majeur pour l'application de ces capteurs à la détection fongique. En effet, une compétition entre les fonctions OH de l'eau et des alcools semble se produire au niveau des sites d'adsorption des polymères. Ces capteurs présentant une forte sensibilité à l'eau, il est indispensable de vérifier que les variations spécifiques aux environnements moisissés ne sont pas masquées par l'impact de l'humidité des chambres. Aussi, le comportement des capteurs a été étudié en plaçant une chambre témoin comme référence (avec les mêmes conditions environnementales que les chambres d'essais, notamment l'humidité relative).

Une variation de comportement entre une chambre contaminée et la chambre témoin a été observée. L'absence de variation entre deux chambres témoins ayant été vérifiée, la réponse obtenue est donc directement liée à la présence de moisissure dans la chambre contaminée.

La saturation en humidité des polymères due à l'utilisation d'une chambre témoin comme environnement de référence donne cependant des profils de réponse difficilement analysables. Les phénomènes de dilution et donc également les variations de l'humidité relative dans les chambres, impliquent des variations de la ligne de base lors du passage d'une chambre à l'autre, interférant ainsi dans le comportement de la réponse avec une chambre contaminée. Un retour à une ligne de base stable par le passage d'air filtré est donc nécessaire afin

d'optimiser l'observation de la différence de comportement entre les deux environnements et d'éviter la saturation du polymère en humidité.

Ce protocole permet cependant de confirmer l'influence des COV fongiques dans le comportement des capteurs face aux ambiances contaminées et d'écarter l'hypothèse que l'humidité pourrait masquer cette différence de comportement. De plus, l'utilisation de modules de prétraitement par la concentration et la séparation de l'échantillon gazeux en amont du module de détection permet d'exposer les capteurs uniquement aux molécules d'intérêt et ainsi de limiter la pollution des couches sensibles.

Lors de ce travail de thèse, des essais ont été menés à partir de 10 capteurs oxydes métalliques du commerce (figaro). Trois de ces capteurs ont été sélectionnés en fonction de leurs affinités avec les fonctions OH (TGS2620, TGS3820 et TGS2180), deux spécifiques du CO<sub>2</sub> (TGS4160 et TGS4161), Deux spécifiques des fonctions CH<sub>4</sub> (TGS2612 et TGS6810), deux spécifiques de contaminants de l'air (TGS2600 et TGS2602) et enfin un spécifique des fonctions sulfides (TGS825). Un système multicapteurs composés d'une combinaison de 38 oxydes métalliques (couche de SnO<sub>2</sub> dopée avec du platine recouverte d'une membrane SiO<sub>2</sub> perméable aux gaz) a également été éprouvé afin d'étudier la sensibilité et la sélectivité de cette famille de capteur aux COV fongiques.

Les résultats obtenus avec ces capteurs n'ont pas permis d'observer de réponse aux COV fongiques étudiés dans cette étude. De plus, les résultats ont permis de mettre en évidence leurs fortes sensibilités à l'humidité et aux variations de température.

L'objectif de cette partie du travail de thèse a donc porté essentiellement sur la recherche et la caractérisation de couches sensibles à partir de polymères conducteurs pour la détection de COV d'origine fongique. Dans ce projet d'élaboration d'un microsystème dédié à l'analyse de COV traceurs d'un développement fongique dans les environnements intérieurs, ces couches sensibles sont destinées à constituer le module de détection en sortie du système.

Les tests préliminaires réalisés à partir de capteurs polymères ont permis de discriminer en laboratoire, un environnement contaminé d'un environnement stérile (Joblin *et al.*, 2010b). Ces essais montrent qu'une détection de moisissures à partir de cette famille de capteurs est envisageable. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus dans diverses études discriminant en laboratoire différents environnements contaminés (Gibson *et al.*, 1997; Canhoto *et al.*, 2004; Dutta *et al.*, 2005; Hamilton *et al.*, 2006; Bailey *et al.*, 2008).

Cependant, dans ces études, la discrimination d'ambiances s'appuie sur la détection d'une empreinte globale ne distinguant pas la nature des COV. Or, Moularat *et al.* ont montré que la détection *in situ* d'un développement fongique par la mesure de COV implique le calcul d'un indice prenant en compte l'origine, la spécificité, et la présence / absence de chaque traceur fongique (Moularat *et al.*, 2008b; Moularat *et al.*, 2008c).

De plus, les systèmes multi-capteurs utilisés pour la discrimination d'ambiances nécessitent la définition d'un environnement de référence stable et s'appuient sur des échantillons avec un bruit de fond stable (COV émis par les supports, matériaux). Cette approche n'est donc pas adaptée à des prélèvements *in situ*. Par ailleurs, à l'heure actuelle, les capteurs polymères restent insuffisamment spécifiques pour permettre la détection de COV individuellement. Un travail sur les chaînes (fonctionnalités) des polymères conducteurs reste donc nécessaire afin d'optimiser leurs sensibilités et leurs sélectivités à différents composés cibles (Li *et al.*, 2007a; Bailey *et al.*, 2008). De surcroît, les concentrations microbiennes utilisées dans les études précédentes, ne sont pas représentatives des concentrations rencontrées dans les environnements réels favorisant ainsi la réaction des capteurs.

Ainsi, suite à ces constats et afin de répondre à un objectif de détection de COV fongique dans un environnement intérieurs, le choix du développement d'une chaîne de prétraitement de l'échantillon en amont du module de détection par concentration et séparation du mélange gazeux a été effectué.



### **CHAPITRE III : CONCEPTION DES MICROMODULES DU SYSTEME D'ANALYSE**

Dans une problématique d'analyse de composés dans l'air, les limites principales des systèmes multi-capteurs sont leurs fortes sensibilités à l'humidité, la dérive et la pollution des couches sensibles des capteurs. Cependant, l'utilisation d'une matrice de capteurs permet un échantillonnage rapide, simple, non envahissant et non destructif, pour la détection et l'identification de composés volatils, sans qu'une formation complexe pour l'utilisateur ne soit nécessaire.

Outre les caractéristiques intrinsèques de ces systèmes multi-capteurs, les mesures réalisées sont relatives à un environnement de référence. Cette constatation ne rend pas directement possible leurs utilisations pour des mesures *in situ* où un environnement de référence stable est impossible à obtenir (cas d'un logement par exemple). De plus, les concentrations en COV fongiques dans un environnement réel sont difficiles à extraire du bruit de fond par l'utilisation directe de capteurs.

La sélectivité intrinsèque des capteurs étant insuffisamment spécifique pour permettre une utilisation *in situ*, un travail sur l'échantillon en amont du module de détection (matrice de capteurs polymères) peut-être envisagé par une technique de séparation du mélange gazeux afin d'en simplifier son analyse. L'évolution des technologies de l'électronique et en particulier de la micro-électronique, a permis d'imaginer, grâce aux développements des procédés de fabrication, la miniaturisation de microsystèmes d'analyse tels que la chromatographie.

Dans cette optique, la concentration d'un échantillon est un facteur de performance important qui joue un rôle déterminant dans l'analyse des gaz utilisant la chromatographie, en particulier dans le cas de détection de composés présents à de faibles concentrations (ppb). Ainsi, dans la problématique de détection de COV issus d'un développement fongique, l'utilisation d'un préconcentrateur est requise afin de pallier à un manque de sensibilité du détecteur. Dans le cas de l'utilisation d'une microcolonne, l'étape de concentration permet également d'augmenter l'efficacité de séparation de la colonne.

Dans ce contexte de miniaturisation, de nombreuses études ont décrit des microchaînes d'analyse séparant les gaz par chromatographie couplée avec un ou plusieurs « modules » de prétraitement ou de système de détection. La capacité à créer des instruments portables et robustes pour des applications *in situ* de mesure chimique, a également été une incitation importante pour les développements récents de ces microstructures.

Cependant, si de nombreux systèmes intégrés sont développés pour la mesure de polluants chimiques, leurs sensibilités et leurs spécificités ne sont pas adaptées à la détection de COV issus du métabolisme fongique. En effet, ces composés spécifiques sont émis en faible quantité par rapport aux autres COV présents dans un environnement intérieur. De plus, la sensibilité du module de détection utilisant des capteurs est altérée par l'humidité relative présente dans ce type d'environnements. La méthode de détection de développement fongique par l'identification de COV cibles implique le calcul d'un indice tenant compte de la présence ou de l'absence de ces traceurs. Or, les systèmes existants ne permettent l'application directe du calcul de ces indices.

Dans ce contexte, cette partie de ce travail de thèse porte essentiellement sur l'étude et l'élaboration d'un microsystème dédié à l'analyse de COV traceurs d'un développement fongique.

Suite à la phase de recherche sur les couches sensibles aux COV d'origine fongique, la deuxième phase de cette partie de l'étude a consisté à développer des microstructures de prétraitement d'un échantillon gazeux utilisées en amont du module de détection. Cette partie de prétraitement du système d'analyse s'appuie sur deux modules décrits dans la littérature traitant du développement de microchaînes d'analyse basées sur la chromatographie en phase gazeuse. Le premier module est donc constitué d'une microstructure de concentration et le deuxième se compose d'une microcolonne chromatographique. Les fonctionnalisations de ces deux modules s'appuient respectivement sur un adsorbant et une phase stationnaire identiques à ceux de la chaîne d'analyse GC classiquement utilisée.

Les essais préliminaires sur des couches sensibles à partir d'un système multicapteurs composés de polymères conducteurs ont permis d'identifier des polymères permettant la distinction entre un environnement stérile et un environnement contaminé par un développement fongique. Ces polymères conducteurs composent ainsi le module de détection en les implémentant en sortie du système par le développement de paires d'électrodes et d'une chambre de confinement.

## I MATERIELS ET METHODES

### I.1 MATERIEL BIOLOGIQUE ET SUPPORT DE CROISSANCE

L'espèce fongique sélectionnée pour ces essais est une souche de l'Institut d'Hygiène et d'Epidémiologie de Bruxelles (IHEM) : *Aspergillus niger*. Cette souche est conservée à 4°C dans de l'eau ultra pure sur milieu S10 (Bouillon de Sabouraud glucosé à 2 % dilué ; Merck). La culture est alternée sur S10 qui constitue un milieu pauvre (milieu plus proche de la réalité) et sur gélose avoine qui est un milieu riche en nutriments. La culture finale est obtenue après 7 jours à 25°C sur gélose avoine.

Quel que soit le milieu nutritif, les cultures sont incubées à 25°C dans l'obscurité. Cette espèce a été choisie car elle est fréquemment retrouvée dans les environnements intérieurs et émet, lors de son développement, tous les traceurs de l'indice de contamination fongique.

Le support de croissance employé est de la toile de verre à peindre. Ce matériau est découpé et stérilisé (121°C, 45 min, chaleur humide) avant d'y ajouter de l'eau distillée.

### I.2 CHAMBRES D'EMISSIONS DE COV SPECIFIQUES

Les essais sur les modules de concentration et de séparation ont également été réalisés à partir de chambres d'émission de 300 mL identiques à celles utilisées précédemment dans cette étude pour le développement des indices de contamination. Des standards de cibles chimiques ont alors été déposés dans ces chambres afin de tester les différents micromodules. Pour cela, huit composés identifiés comme traceurs d'un développement fongique ont été utilisés. La liste de ces standards (SIGMA-ALDRICH) est décrite Tableau III-1.

Tableau III-1 : Liste des standards pour la validation des modules de prétraitement

Composé	Pureté (%)
2-méthylfurane	99
3-méthyl-1-butanol	99
2-méthyl-1-butanol	99
4-heptanone	98
3-heptanol	99
méthoxybenzène	99
$\alpha$ -pinène	98
1-octène-3-ol	98

Ces 8 traceurs ont été mis en solution dans de l'éthanol afin d'obtenir une concentration à  $5 \text{ g.L}^{-1}$ .

Le support de croissance employé est de la toile de verre. Ce matériau est découpé et stérilisé ( $121^\circ\text{C}$ , 45 min, chaleur humide) avant d'y ajouter de l'eau distillée. Chacune des chambres contient, 50 mL de billes de verre et 5 mL d'eau distillée. Après disposition du support dans les chambres, le taux de charge obtenu est de  $7.10^{-2} \text{ cm}^2/\text{cm}^3$ .

A partir de ces chambres d'émission, trois ambiances ont été développées, une ambiance témoin (absence de contamination), une ambiance contaminée par *Aspergillus niger* et une ambiance contenant une solution des 8 standards. La préparation de la suspension de spores utilisée pour la contamination par *Aspergillus niger* est réalisée en versant 50 mL d'eau ultra pure sur la souche repiquée sur avoine.

Pour le conditionnement des différentes chambres, de l'air filtré sur charbon actif (élimination de COV présents avant le début de la croissance) est passé pendant 30 min. Les chambres sont ensuite placées dans une étuve durant 7 jours à  $25^\circ\text{C}$  et à l'obscurité.

### I.3 ECHANTILLONNAGE ET ANALYSES DES COV

#### I.3.A Echantillonnage des COV

Pour l'échantillonnage et l'analyse des COV lors de la phase de validation des microstructures, deux chaînes analytiques ont été utilisées. Ainsi, deux techniques de prélèvement sont nécessaires afin de permettre un échantillonnage compatible avec le système d'injection de chacune des deux chaînes analytiques.

Concernant la première chaîne analytique (Perkin Elmer), l'échantillonnage est réalisé à partir de *tube Tenax*. Comme pour la partie de développement des indices de contamination, les échantillonnages sur tube Tenax sont effectués en dynamique avec un débit de  $100 \text{ mL.min}^{-1}$  durant 30 min dans une chambre à l'aide d'une pompe à air FL-1001, Flec.

Ainsi, les COV sont piégés dans des tubes en acier inoxydable, présentés sur la Figure III-1, contenant un adsorbant solide approprié pour les COV contenant 4 à 18 atomes de carbone, le Tenax TA (*Supelco*).

Cet adsorbant est un polymère poreux fondé sur de l'oxyde de 2,6-diphénylène dont la granulométrie varie de 0,18 mm à 0,25 mm (60 mailles à 80 mailles). Un nettoyage préalable du Tenax TA par conditionnement thermique, sous un flux d'azote est réalisé.



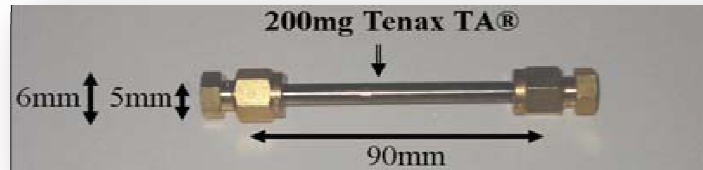


Figure III-1 : Photographie d'un tube Tenax

Le tube Tenax est ensuite désorbé avec un thermo-désorbiteur automatique permettant ainsi de libérer les COV piégés. L'échantillon ainsi désorbé est injecté directement dans la colonne. La désorption thermique est une technique d'extraction de composés organiques volatils à partir d'une matrice solide, par chauffage d'un échantillon balayé par un flux de gaz inerte. Les composés sont adsorbés sur un piège froid à  $-30^{\circ}\text{C}$  puis désorbés à  $300^{\circ}\text{C}$  avant d'être dirigés vers la colonne chromatographique où ils seront séparés.

La seconde chaîne (Hewlett Packard) ne comprend pas de thermo-désorbiteur. Dans ce cas, l'échantillonnage de COV est réalisé à partir de *vials* (flacon en verre d'un volume de 2 ml), dans lesquels sont recueillis les échantillons de gaz à analyser (Figure III-2). Les émissions issues des chambres sont alors prélevées par une pompe à membrane SP 725 EC avec un débit de  $6,2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  durant 30 min dans une chambre contenant un vial de prélèvement.



Figure III-2 : Chambre contenant un vial de prélèvement

L'échantillon de gaz est alors confiné dans le vial permettant ensuite à l'injecteur automatique de la chaîne d'analyse de prélever un volume d'air à l'aide d'une seringue dans un des vials présents sur le passeur automatique.

### I.3.B Description des chaînes analytiques

Les 2 chaînes analytiques, Perkin Elmer et Hewlett Packard, utilisées pour analyser les COV consistent en la combinaison de deux techniques :

- La chromatographie en phase gazeuse (GC) utilisée pour séparer les COV.
- La spectrométrie de masse (MS) employée pour identifier ces composés.

Les caractéristiques des deux chaînes d'analyse, Perkin Elmer et Hewlett Packard, utilisées pour la validation des microstructures sont précisées respectivement dans les Tableau III-2 et Tableau III-3.

## Deuxième partie : Conception des micromodules du système d'analyse

Tableau III-2 : Caractéristiques du GC/MS Perkin Elmer

Paramètres	Conditions analytiques
Thermo-désorbeur	Turbomatrix ATD (Perkin Elmer)
Température de désorption	370 °C
Débit de désorption	50 ml/min Azote N50
Durée de désorption	15 min
Température du piège froid (Tenax TA)	-30 °C
Température d'injection (40°C/s)	300 °C
Température de la ligne de transfert	220 °C
Chromatographe gaz / Spectromètre de masse	Autosystem XL / Turbomass (Perkin Elmer)
Colonne capillaire	CP-SIL PONA CB
caractéristiques géométriques de la colonne : longueur; diamètre interne; épaisseur de la phase stationnaire	50 m ; 0,21 mm ; 0,5 µm
Gaz vecteur	Hélium N60
Pression constante	37,5 psi
Cycle de température	- 40 °C pendant 2 min. - 1°C/min. jusqu'à 41°C - plateau de 2 min. - 0,3 °C/min. jusqu'à 44°C pendant 2 min - 1 °C/min. jusqu'à 47°C - plateau de 2 min.
Paramètres du spectromètre de masse	Quadripôle mode EI, balayage (33-400)

Tableau III-3 : Caractéristiques du GC/MS Hewlett Packard

Paramètres	Conditions analytiques
Température d'injection (40°C/s)	300 °C
Température de la ligne de transfert	200 °C
Chromatographe gaz / Spectromètre de masse	HP 6890 / HP 5973
Colonne capillaire	HP-SMSUI (phase : 5% Phényl 95% Méthylpolysiloxane)
caractéristiques géométriques de la colonne : longueur; diamètre interne; épaisseur de la phase stationnaire	30 m; 0,25 mm; 0,25 µm
Gaz vecteur / débit	Hélium / 0.5 mL/min
Cycle de température	Isotherme 40 °C durant 10 min
Interface	200 °C
Paramètres du spectromètre de masse	Quadripôle mode EI, balayage (20-700)
Température MS source	230°C
Température MS quadripôle	150°C

Pour les 2 chaînes analytiques, les spectres obtenus sont comparés à une bibliothèque de spectres de masse (NIST, 1998).

Deux modes d'analyse ont été utilisés pour la détection des composés :

- Le mode dit "de balayage" ou "fullscan", employé lorsque l'on souhaite enregistrer des spectres dit "de source", c'est-à-dire des spectres où sont présents tous les ions produits dans la source à un instant donné.

- Le mode "SIM" ("Single Ion Monitoring"), qui consiste à ne détecter qu'un (ou quelques) ion(s). Le spectromètre de masse fonctionne donc comme un filtre. Celui-ci est programmé pour ne détecter que quelques ions caractéristiques des analytes étudiés (1 à 4, en général). L'augmentation du signal associé à la détection des analytes permet un gain en sensibilité tout en diminuant le bruit de fond chromatographique. Avec un quadripôle, la durée du balayage (dwell) des ions est proportionnelle à la gamme de rapports m/z balayée. Opérer sur peu de valeurs de m/z augmente donc considérablement le temps imparti à la détection des ions correspondants, comparativement au mode "fullscan". Le mode "SIM" est utilisé lorsque de faibles concentrations d'échantillon sont injectées.

Ainsi, lors d'un prélèvement sur tube Tenax, un split en sortie de la colonne permet d'injecter 3 % du volume de l'échantillon prélevé soit 90 mL afin de protéger le détecteur en cas de concentration trop importante d'un composé.

Dans le cas d'un prélèvement avec vial, le volume injecté est de 5 µL. Il y a donc facteur de dilution de 18 000 en comparaison avec une analyse d'un échantillon prélevé sur tube Tenax. Le Tableau III-4 répertorie les caractéristiques de prélèvement en fonction des deux modes d'échantillonnage utilisés.

Tableau III-4 : Caractéristiques des prélèvements

Mode de prélèvement	Tube Tenax	Vial
Débit (mL.min <sup>-1</sup> )	100	6,2
Durée (min)	30	30
V <sub>prélèvement</sub> (mL)	3000	186
V <sub>injection</sub>	90 mL	5 µL

## I.4 DISPOSITIFS DE VALIDATION DES MODULES

### I.4.A Module de préconcentration

La microstructure de concentration développée dans cette étude se compose d'un substrat de silicium dans lequel des sillons de 60 mm de longueur pour une largeur de 500 µm sont gravés. La fusion avec un substrat en verre permet la réalisation de cavités closes. La microstructure est ensuite fonctionnalisée avec des grains de Tenax avec un diamètre moyen de 120 µm. Des connecteurs fluidiques adaptés à ce type de microstructures permettent d'équiper les orifices d'accès des micromodules de capillaires afin de permettre la connexion avec une pompe et permettre une circulation d'air à travers la structure.

Le protocole de test concernant la microstructure de concentration nécessite l'utilisation de deux types d'échantillons, un échantillon avec les traceurs (chambre d'émission contenant le mélange de 8 traceurs) et un échantillon avec une contamination fongique (chambre d'émission contenant de la toile de verre contaminée par *Aspergillus niger*).

Le protocole de test consiste à prélever de l'air des différentes chambres à travers le préconcentrateur pendant 30 min à un débit de 6,2 mL.min<sup>-1</sup> par l'intermédiaire d'une pompe à membrane SP 725 EC. L'échantillon issu du préconcentrateur est ensuite désorbé à 140°C pendant 30 min et extrait via la pompe dans une chambre contenant un vial de prélèvement. L'échantillon issu du préconcentrateur contenu dans le vial est alors analysé sur une chaîne d'analyse GC/MS.

#### I.4.B Module de séparation

La microstructure de séparation développée dans cette étude se compose également d'un substrat de silicium dans lequel un sillon d'une longueur de 5 m de longueur, pour une largeur de 150  $\mu\text{m}$  et une profondeur de 200  $\mu\text{m}$ , est gravé. La fusion avec un substrat en verre permet la réalisation du canal. La microstructure est ensuite fonctionnalisée avec une phase stationnaire composée de PDMS pour permettre la rétention des molécules la traversant. Comme pour la microstructure de concentration, des connecteurs fluidiques adaptés permettent d'équiper les orifices d'accès des micromodules de capillaires afin de permettre la connexion avec une pompe et permettre la circulation du flux d'air à travers la structure. Une fois la microcolonne chromatographique réalisée et fonctionnalisée, des essais ont été réalisés afin de vérifier son efficacité de rétention et de séparation de différents composés cibles de l'étude.

Pour cela, le banc d'analyse de chromatographie en phase gazeuse utilisé lors du développement des indices de contamination, a été utilisé en remplaçant la colonne chromatographique classique par la microcolonne (Figure III-3). Le spectromètre de masse a été employé en sortie pour identifier les composés.

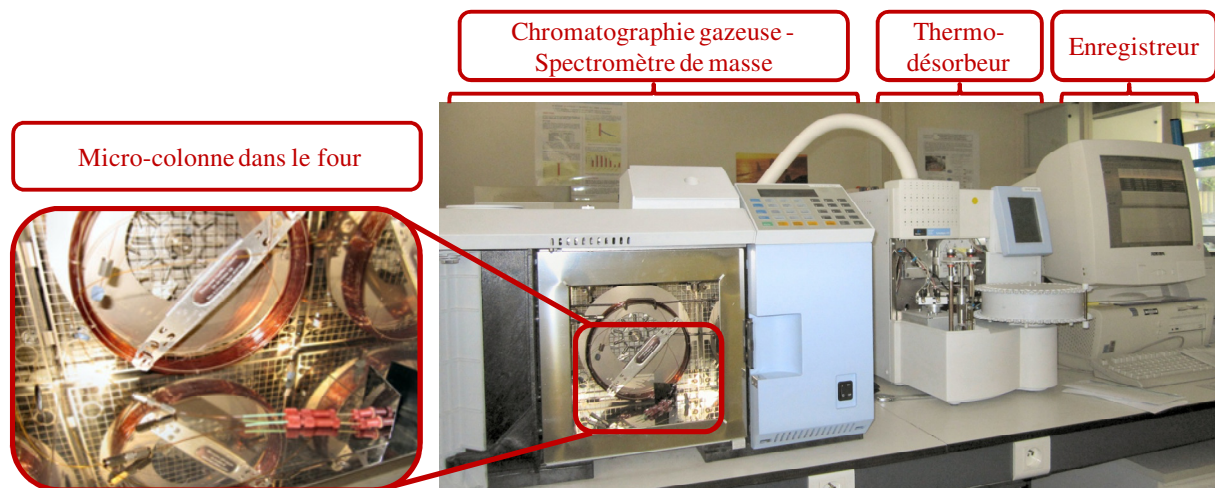


Figure III-3 : Photographie du banc d'analyse de chromatographie en phase gazeuse avec la microcolonne

Deux types d'échantillons ont également été utilisés dans le protocole de test de la microcolonne, un échantillon avec les traceurs (chambre d'émission contenant le mélange de 8 traceurs) et un échantillon avec une contamination fongique (chambre d'émission contenant de la toile de verre contaminée par *Aspergillus niger*). Les échantillons d'air des différentes chambres sont prélevés à l'aide de tube Tenax à un débit de 100  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  pendant 30 min par l'intermédiaire d'une pompe (Air Pump 1001, Flec). Les tubes sont ensuite placés dans le thermo-désorbeur automatique de la chaîne d'analyse GC/MS pour permettre leurs analyses. Les échantillons sont ainsi séparés par la microcolonne et analysés en sortie par spectrométrie de masse afin de vérifier l'efficacité de rétention. Dans le protocole de test de la microcolonne, la méthode de prélèvement par vial a également été utilisée. Les échantillons ont également été analysés en remplaçant la colonne classique par la microcolonne dans la seconde chaîne d'analyse GC/MS.

## II DEVELOPPEMENT DES MODULES DU SYSTEME

### II.1 PROCEDE DE FABRICATION DES MODULES DE PRETRAITEMENT

En parallèle des études portant sur la caractérisation des réponses des capteurs chimiques, en particulier sur leurs sélectivités intrinsèques, un travail sur l'échantillon en amont du capteur est également envisagé par séparation du mélange gazeux. Dans cette optique, la séparation se fait par chromatographie, qui permet d'exposer le(s) capteur(s) aux différents composés d'un mélange complexe, les uns après les autres. L'évolution des technologies de l'électronique et en particulier de la micro-électronique, a permis d'imaginer, grâce aux développements des procédés de fabrication, la miniaturisation de microsystèmes d'analyses tels que la chromatographie.

Ainsi, cette partie de l'étude est consacrée à la réalisation de deux micromodules, une microcolonne chromatographique permettant la séparation de l'échantillon gazeux (*module de séparation*) et une microstructure de concentration permettant d'augmenter l'efficacité de l'analyse (*module de préconcentration*).

#### II.1.A Eléments constitutifs de micromodules

Afin de définir le procédé de fabrication des micromodules, le premier choix technologique concerne le substrat utilisé pour la gravure des motifs. Le silicium constitue un matériau de base très largement utilisé pour la réalisation de microsystèmes de part ses caractéristiques mécaniques et électriques. Le silicium monocristallin est abondant et peu cher, et constitue un matériau très adapté à la miniaturisation.

Les dispositifs ont été réalisés sur substrat silicium à partir de wafers doubles faces de diamètre 4 pouces (environ 10 cm) et d'épaisseur 500  $\mu\text{m}$  (entre 475 et 525  $\mu\text{m}$ ).

La réalisation de structures microfluidiques nécessite de pouvoir réaliser une connexion entre le microsystème et le système de circulation d'air (micropompe, vanne...). La solution retenue dans cette étude est l'utilisation de « NanoPort ». Ces connecteurs fluidiques sont adaptés aux microstructures et permettent d'équiper les orifices d'accès des micromodules de capillaires. La mise en place de ces connecteurs nécessite un bon alignement entre l'orifice d'accès de la microstructure et l'orifice du connecteur permettant l'insertion des capillaires. Ces connecteurs se composent, d'un anneau de colle, d'un joint d'étanchéité, du corps du connecteur, et enfin de la « vis » permettant l'insertion du capillaire.

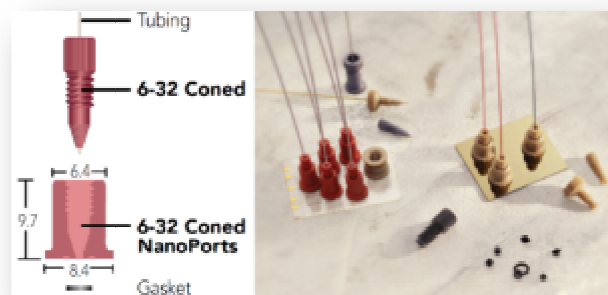


Figure III-4 : Connecteurs fluidiques commerciaux

Les tubes utilisés dans cette étude pour réaliser les connexions entre les différents modules du système sont des tubes PEEK de diamètre extérieur 1/32 pouces (800  $\mu\text{m}$ ) et de diamètre intérieur 0,008 pouces (200  $\mu\text{m}$ ).

L'utilisation de deux modules que sont une microcolonne chromatographique ainsi qu'une microstructure de concentration nécessite de pouvoir en contrôler la température. En effet, la température d'une colonne influence son efficacité et les structures de concentration nécessitent une température de chauffe afin de pouvoir libérer les molécules piégées. Dans cette optique, des résistances de chauffe ont donc été intégrées aux micromodules.

Le matériau le plus souvent utilisé dans la littérature pour ce type d'application est le platine. En plus d'un coefficient de température positif, d'un bon facteur de sensibilité, ce matériau présente une résistivité élevée. Un matériau de forte résistivité présente l'avantage de dissiper de grande quantité de chaleur par effet joule. Le platine est également caractérisé par une grande linéarité en température. L'utilisation du platine nécessite cependant l'utilisation d'une couche d'accroche. Le matériau utilisé pour réaliser cette couche d'accroche est le titane. Les épaisseurs de dépôts sont, respectivement pour le titane et le platine, de 50 et 100 nm.

### II.1.B Conception de masques

L'utilisation de la lithographie reste, au travers des technologies silicium, une voie très largement utilisée pour la fabrication de microstructures telles que les microcolonnes chromatographique ou les microstructures de concentration. Elle permet de réaliser des structures à fortes résolutions. L'approche utilisée généralement pour la réalisation de ce type de structures est dite « *top-down* », c'est-à-dire qu'à partir du substrat, le procédé vient graver le motif dans la matière.

La lithographie nécessite donc préalablement de concevoir des masques, utilisés dans le procédé de fabrication proprement dit, permettant de définir des zones d'expositions et donc les zones de gravure du substrat. La conception de ces masques a été réalisée sous le logiciel Coventor 2008.

Ces masques permettent ainsi de définir la géométrie finale des structures. Pour la réalisation de nos deux modules, « *séparation* » et « *concentration* », 3 niveaux de masques ont donc été nécessaires : le premier définissant la géométrie des sillons gravés sur la face avant, le deuxième, sur la face arrière, pour la création des orifices d'accès de la structure, enfin le troisième, pour la réalisation des résistances chauffantes également sur la face arrière.

***Masques de la microcolonne.*** Le premier masque concerne donc la géométrie des sillons de la colonne. Plusieurs formes géométriques peuvent être envisagées concernant l'agencement des sillons d'une microcolonne pour limiter l'encombrement et donc la taille de la structure. Dans cette étude, la forme géométrique retenue est une configuration type « serpent ». Afin de limiter les volumes morts et faciliter le remplissage colonne, les coudes de la colonne entre chaque sillon ont été réalisés sous forme d'arc de cercle permettant la réalisation d'une structure ne présentant pas d'angles droits. Le choix de la longueur de la colonne a été fixé à 5 m. Le choix de cette longueur relativement importante pour ce type de microstructure provient du fait que ce dispositif doit permettre la séparation d'échantillons complexes de différents composés. Le choix d'une longueur importante permet ainsi d'améliorer l'efficacité de la colonne et donc obtenir une meilleure séparation des composés.

Les caractéristiques géométriques de la puce pour la réalisation de la microcolonne sont reportées dans le Tableau III-5.



Tableau III-5 : Caractéristiques géométriques (en  $\mu\text{m}$ ) de la puce microcolonne

Sillons				Coudes		Puce	
Longueur	Largeur	Espace entre sillon	Nombre de sillons	Rayons des coudes	Largeur des coudes	Longueur	Largeur
30000	150	100	162	125	150	41400	40900

Comme pour le choix des résines photosensibles positives ou négatives, dans un procédé de fabrication, le choix de la « polarité » du masque lors de la conception des masques doit être précisé. Ainsi, les données imprimées sur le masque (« *digitized data* ») doivent être précisées soit en clair (« *clear* »), avec un fond opaque, soit opaque (« *dark* »), avec un fond clair. Pour la réalisation de ce premier niveau de masque, la polarité a été choisie avec les données en clair.

Le deuxième niveau de masque concerne les orifices d'accès à la microstructure. Le choix retenu dans cette étude est d'accéder à la structure par la face arrière du substrat via des NanoPorts permettant la connexion entre le microsystème et le système de circulation d'air à l'aide de tube PEEK. Le diamètre interne des tubes PEEK choisi étant de 200  $\mu\text{m}$  pour un diamètre externe de 800  $\mu\text{m}$ , les dimensions des orifices d'accès retenues sont de 400  $\mu\text{m}$  de diamètre afin de faciliter le positionnement du NanoPort. En effet, ces dimensions permettent la mise en butée du tube sur la structure et évitent un risque de chevauchement des orifices du tube et de la structure. La polarité de ce masque a également été choisie avec les données en clair.

Le troisième niveau de masque concerne la création de résistances chauffantes utilisées pour chauffer et contrôler la température de la structure. La bibliographie montre l'importance de la température dans la réalisation de ce type de microstructure de séparation.

La valeur d'une résistance dépend de ces caractéristiques géométriques puisqu'elle est définie par la formule suivante :

$$R = \rho \frac{l}{S} = \frac{\rho l}{e w}$$

Où  $\rho$  est la résistivité du matériau,  $l$  la longueur,  $w$  la largeur,  $S$  la surface, et  $e$  l'épaisseur.

Les résistances chauffantes peuvent être intégrées aux microstructures, néanmoins, dans un premier temps, une enceinte de confinement intégrant une résistance chauffante externe est utilisée.

La présence de motifs d'alignement est nécessaire lors de phase de lithographie afin de pouvoir superposer les différents masques et d'aligner les différents motifs présents sur chaque masque. Le positionnement des différents masques s'effectue par l'alignement et la superposition de deux figures géométriques. Les motifs d'alignement généralement retrouvés et utilisés dans cette étude sont des croix (Figure III-5).

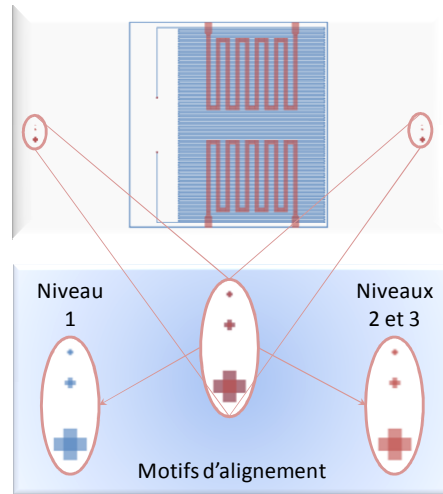


Figure III-5 : Représentation des motifs d'alignements

Dans cette étude, la présence de motifs d'alignement permet notamment de positionner les orifices d'accès sur la face arrière avec les orifices d'entrée/sortie présents sur la face avant aux extrémités des microcanaux. Dans ce cas, la précision des motifs d'alignement est d'autant plus importante qu'un décalage de quelques micromètres entre ces deux motifs peut rendre la structure inutilisable. L'utilisation de motifs d'alignement de petites dimensions permet ainsi d'obtenir des précisions d'alignement de l'ordre de 1  $\mu\text{m}$ .

Des motifs d'alignement sont également présents sur le masque des résistances chauffantes afin de les positionner sous la surface formée par les microcanaux.

Une image des différents niveaux de masques développés sous Coventor 2008 pour la réalisation d'une puce microcolonne, est présentée en Figure III-6.

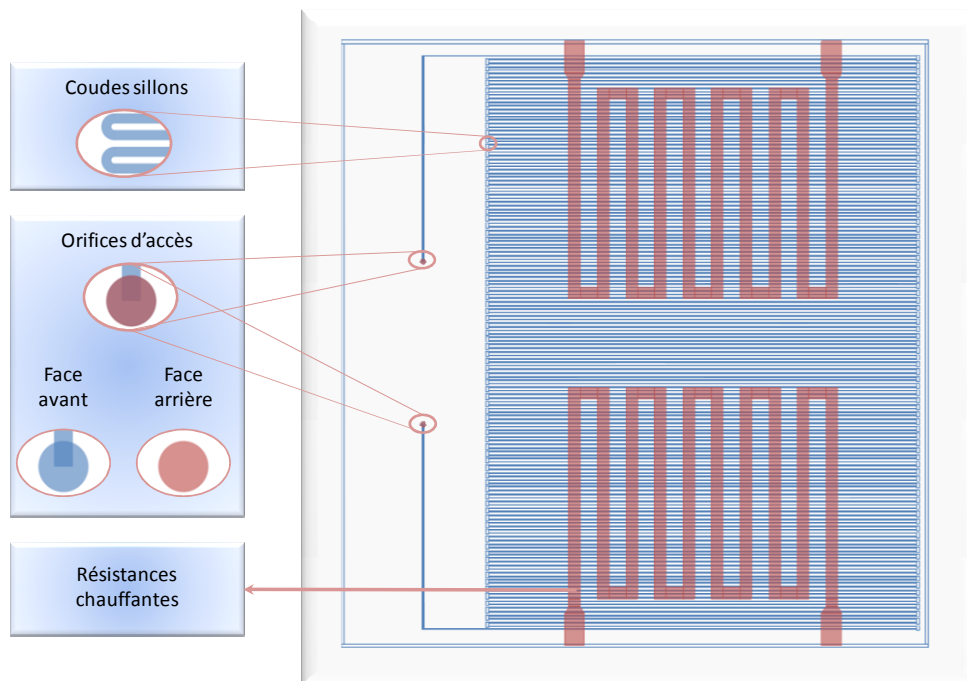


Figure III-6 : Représentation des 3 niveaux de masque pour la réalisation d'une microcolonne chromatographique



**Masque du micropréconcentrateur.** Pour la réalisation de microstructure de concentration, plusieurs formes géométriques sont également envisageables. Le matériau adsorbant utilisé dans cette étude permettant de piéger les molécules sélectionnées pour la détection fongique, est le TENAX TA. Afin de faciliter le remplissage de la structure avec ce matériau (disponible sous forme de grain), une structure ne contenant aucun coude a été retenue. Les tubes TENAX de prélèvement classiquement utilisés pour la détection des COV dans notre étude contiennent un volume utile de  $1 \text{ cm}^3$  (longueur de 5 cm pour un diamètre de 0,5 cm), avec des grains de diamètre moyen de  $300 \mu\text{m}$ . Pour la réalisation de la microstructure de préconcentration, la taille des grains utilisée est plus petite (diamètre moyen de  $120 \mu\text{m}$ ). L'utilisation d'un diamètre inférieur permet d'augmenter la surface spécifique (6 fois), par conséquent, une réduction du volume utile à  $0,25 \text{ cm}^3$  (par 4) a été retenue. Des sillons de 60 mm de longueur pour une largeur de  $500 \mu\text{m}$  ont ainsi été développés.

Afin de retenir les grains dans la microstructure lors du passage de l'air, une grille a été fabriquée à l'aide de micropiliers en sortie de la structure. La taille des grains de TENAX insérés dans la structure pouvant atteindre un diamètre minimum de  $75 \mu\text{m}$ , les dimensions de la grille retenue sont des piliers de  $56 \mu\text{m}$  de large pour un espace entre les piliers de  $55 \mu\text{m}$ .

Les caractéristiques géométriques de la puce pour la réalisation du micropréconcentrateur sont reportées dans le Tableau III-6.

Tableau III-6 : Caractéristiques géométriques (en  $\mu\text{m}$ ) de la puce de préconcentration

Sillons				Grille Tenax		Puce	
Longueur	Largeur	Espace entre sillon	Nombre de sillons	piliers	Espace entre piliers	Longueur	Largeur
60000	500	50	20	56	55	84600	11450

Concernant les orifices d'accès sur le deuxième niveau de masque, la solution technologique (NanoPorts) et les caractéristiques géométriques des orifices retenues sont identiques à celles utilisées pour la réalisation de la puce microcolonne.

Comme pour la conception des masques de la microcolonne, l'intégration de résistances chauffantes au module de préconcentration est également envisagée et un troisième niveau de masques a donc été développé. Cependant, une enceinte de confinement est également prévue dans un premier temps afin de pouvoir utiliser une résistance chauffante externe.

Une image des différents niveaux de masque développés sous Coventor 2008 pour la réalisation d'une puce de préconcentration, est présentée en Figure III-7.

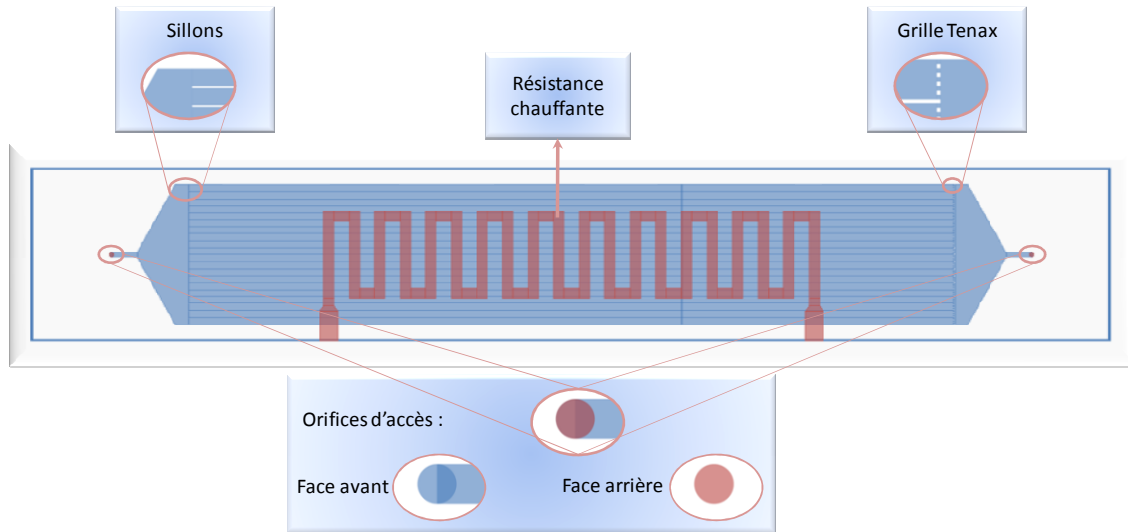


Figure III-7 : Représentation des 3 niveaux de masque pour la réalisation d'une microstructure de préconcentration

### II.1.C Procédé de fabrication

La réalisation de telles structures pose naturellement le problème du choix d'une procédure de fabrication, ou plus exactement d'une technique de gravure, compatible avec de telles résolutions. Les dimensions caractéristiques des canaux sont de l'ordre de la centaine de microns et les sections sont classiquement de forme rectangulaire, semi-circulaire ou circulaire. D'après la bibliographie, la forme de la section pour les colonnes capillaires n'influence pas l'efficacité de séparation de la colonne. Cette remarque permet donc de ne pas s'imposer de contrainte concernant la forme de gravure définie par le procédé de fabrication.

La DRIE est un procédé de fabrication permettant de réaliser des gravures anisotropes profondes à fort rapport d'aspect. Le choix de section rectangulaire réalisée par gravure DRIE a ainsi été retenu.

Pour les deux modules de prétraitement de l'échantillon que sont la microcolonne et le préconcentrateur, le procédé de fabrication retenu est sensiblement le même et détaillé ci-dessous en Figure III-8. La différence principale dans le procédé entre les deux modules concerne la profondeur de gravure des sillons. Ainsi, une profondeur de gravure de 200 $\mu\text{m}$  a été définie pour les canaux formant la microcolonne chromatographique et une profondeur de gravure de 400 $\mu\text{m}$  a été définie pour les sillons de la structure de préconcentration.

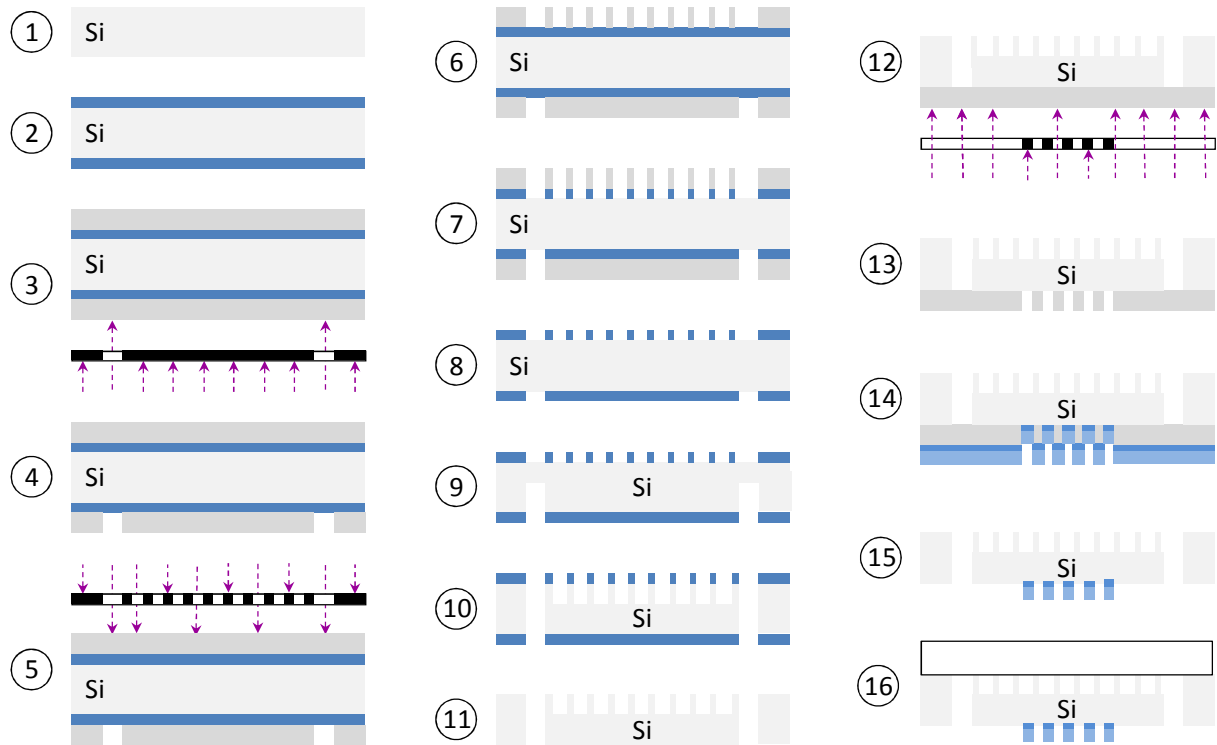


Figure III-8 : Représentation schématique du procédé de fabrication des micromodules

#### Etape 1 : Nettoyage du wafer

Le wafer est trempé dans un bain de HF 1 % jusqu'à obtenir l'hydrophobie. Celui-ci est ensuite rincé dans de l'eau déionisée pendant 5 min. Le nettoyage consiste, dans un premier temps à dissoudre les impuretés organiques à l'aide d'acide sulfurique ( $H_2SO_4$  à  $150^\circ C$  pendant 3 min). Dans un deuxième temps, les impuretés métalliques sont piégées par la formation d'un oxyde de surface à l'aide d'acide nitrique ( $HNO_3$  pendant 3 min). Le wafer est ensuite de nouveau rincé 5 min dans l'eau déionisée, puis la couche d'oxyde formée est supprimée par un nouveau bain de HF 1 %, avant un dernier rinçage à l'eau déionisée. Le wafer est ensuite séché sous azote.

#### Etape 2 : Le dépôt d'Aluminium

La gravure par DRIE nécessite l'utilisation d'une couche de protection permettant de définir les zones où le substrat ne sera pas gravé. La couche de protection utilisée dans cette étude est une couche d'aluminium de  $5000 \text{ \AA}$  (soit 500 nm) d'épaisseur. Le dépôt est réalisé par pulvérisation cathodique à température ambiante ( $24^\circ C$ ) dans un plasma d'argon. L'accélération des ions est obtenue par une différence de potentiel de 0.5 kV. Le dépôt est réalisé sous basse pression, à  $3.10^{-7}$  Torr. La durée du dépôt dépend de l'épaisseur souhaitée d'aluminium. La vitesse de dépôt, avec ces paramètres, étant d'environ  $1000 \text{ \AA}/\text{min}$ , le dépôt dure 5 min.

Les étapes suivantes consistent à définir les zones de gravure par DRIE du wafer, c'est-à-dire des zones non protégées par une couche d'aluminium. Ces étapes comportent donc une phase de photolithographie UV classique sur chaque face du wafer puis une gravure humide de la couche de l'aluminium.

*Etapes 3, 4, 5 et 6 : définition des zones de gravure*

L'étape 3 consiste donc à déposer sur chaque face du wafer une couche de résine photosensible. Dans notre cas, la résine choisie est une résine positive (PFR 7790), c'est-à-dire que les zones de résine exposées aux UV seront dissoutes. La résine est tout d'abord déposée de manière uniforme sur une face du wafer, à l'aide d'une tournette. Les paramètres d'étalement de la résine (vitesse de rotation, accélération et surtout viscosité de la résine) conditionnent l'épaisseur finale de dépôt. L'épaisseur voulue étant de 1,2  $\mu\text{m}$ , la vitesse de rotation pour la résine choisie est de 4500  $\text{tr}\cdot\text{min}^{-1}$  pour une accélération de 2000  $\text{tr}\cdot\text{min}^{-2}$  pendant 30s. L'utilisation de couche de résine sur les deux faces du wafer nécessite un recuit court de la résine (5 min à 110°C) afin de durcir celle-ci et d'évacuer une partie des solvants. Le dépôt de la résine sur la deuxième face du wafer est ensuite réalisé dans les mêmes conditions suivi d'un recuit pendant 15 min à 100°C.

La première étape de photolithographie sur la face arrière peut maintenant être effectuée. Les paramètres d'exposition (puissance de la lampe et temps d'exposition) permettent de définir la netteté des motifs. Dans notre cas, le temps d'insolation est fixé à 10 s avec une puissance de la lampe à 345 W.

L'étape 4 consiste ensuite à développer la résine notamment dans le but de faire apparaître les motifs d'alignement afin de pouvoir aligner le masque de la face avant, lors de l'insolation. Le wafer est donc plongé dans le bain révélateur (PRD 238) pendant 1 min 10s. Le wafer développé est ensuite rincé à l'eau déionisée pendant 3 min et séché.

L'étape 5 consiste ensuite à réaliser la photolithographie sur la face avant. Pour cela, un alignement entre les motifs du masque et ceux du wafer sur la face arrière est nécessaire avant l'insolation. Les coordonnées des motifs du wafer sont mémorisées et la position du masque peut ensuite être alignée sous microscope avec les coordonnées de ces motifs. Une fois l'alignement réalisé, les conditions d'exposition de la face avant sont les mêmes que pour celles de la face arrière.

L'étape 6 consiste à développer la résine dans le bain révélateur et ainsi faire apparaître les motifs de la face avant. Le wafer est plongé dans le bain jusqu'à apparition totale des motifs. Un deuxième recuit est enfin nécessaire pour chauffer le wafer afin de durcir complètement la résine. Cette étape de recuit est effectuée en étuve à 100°C pendant 15 min. Le wafer est de plus nettoyé à l'aide d'un plasma  $\text{O}_2$  afin d'éliminer les résidus de résine (notamment le fond des trous graver) après le développement et améliorer la netteté des trous dans la résine.

*Etape 7 : gravure de l'aluminium*

La gravure de l'aluminium est réalisée dans une solution chimique composée d'acides permettant d'attaquer l'aluminium (« Al etch »). La solution est maintenue à une température de 30°C. Le contrôle de la gravure s'effectue visuellement jusqu'à élimination totale de la couche d'aluminium dans les zones délimitées par la résine. Le wafer est ensuite rincé dans l'eau déionisée.

*Etape 8 : suppression de la couche de résine*

Une fois la couche d'aluminium gravée, le wafer est plongé dans l'acétone afin de supprimer la couche de résine et le wafer est ensuite passé au rinceur. Le rinceur est un tambour avec un nettoyage à l'eau d'abord mis en rotation à 300  $\text{tr}\cdot\text{min}^{-1}$ , puis à 1 000  $\text{tr}\cdot\text{min}^{-1}$  et légèrement chauffé afin de sécher le wafer.

*Etape 9 et 10 : gravure face arrière et face avant*

Lors de la gravure DRIE pour la création des orifices d'accès, la gravure doit être effectuée sur la totalité de l'épaisseur du substrat, une partie étant gravé par la face avant avec les sillons, l'autre partie par la face arrière. Une sur-gravure par la face arrière (la profondeur de gravure par la face avant étant fixée par la profondeur des sillons) est nécessaire afin d'obtenir une paroi verticale sur l'intégralité du substrat. En effet, sans cette sur-gravure, l'intersection entre les gravures de chaque coté du substrat s'accompagnerait d'une réduction de diamètre du trou.

Pour la puce microcolonne, la profondeur de gravure des sillons est fixée à 200  $\mu\text{m}$ . L'épaisseur de substrat étant de 500  $\mu\text{m}$ , la profondeur de gravure par la face arrière est donc fixée à 360  $\mu\text{m}$  (dont 60  $\mu\text{m}$  de sur-gravure).

Pour la puce du préconcentrateur, la profondeur de gravure des sillons est fixée à 400  $\mu\text{m}$ . L'épaisseur de substrat étant de 500  $\mu\text{m}$ , la profondeur de gravure par la face arrière est donc fixée à 160  $\mu\text{m}$  (dont 60  $\mu\text{m}$  de sur-gravure).

2 types de gaz sont injectés en alternance pour réaliser une gravure DRIE, le premier étant du  $\text{SF}_6$  pour la gravure du silicium, injecté dans l'enceinte à 300  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  pendant 6s, le second du  $\text{C}_4\text{F}_8$  pour le dépôt du film inhibiteur, injecté dans l'enceinte à 150  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  pendant 2 secondes. La pression dans l'enceinte est comprise entre 3 et 4 Pa. Des cycles de 45 min de gravure sont utilisés (notamment pour éviter une chauffe trop importante du wafer). Une mesure de la profondeur de gravure après un temps donné permet de définir le temps de gravure nécessaire pour obtenir une profondeur voulue. Dans les conditions utilisées, la vitesse de gravure est généralement proche de 5  $\mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ .

Une fois la gravure DRIE terminée sur la face arrière, la gravure DRIE sur la face avant est réalisée dans les mêmes conditions. Les profondeurs de gravure sont respectivement fixées pour la puce microcolonne et la puce du préconcentrateur, à 200  $\mu\text{m}$  et 400  $\mu\text{m}$ .

*Etape 11 : Elimination de la couche d'aluminium*

Suite aux étapes de gravure DRIE, le wafer est plongé dans un bain d'acide permettant d'éliminer les couches d'aluminium. La solution d'acide est maintenue à une température de 60°C, permettant ainsi d'accélérer le processus de gravure des résidus d'aluminium. Le wafer est ensuite nettoyé dans un bain d'eau oxygénée ( $\text{H}_2\text{O}_2$  30 %) / acide sulfurique ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) pendant 15 min puis sous plasma  $\text{O}_2$  chaud (225°C) pour éliminer le reste des résidus.

*Etapes 12, 13, 14 et 15 : Réalisation des résistances chauffantes*

Les étapes suivantes permettent ensuite la réalisation des résistances chauffantes en titane / platine. Le procédé utilisé pour le dépôt des résistances est un procédé « lift-off », c'est-à-dire une technique additive (en opposition aux techniques de gravure) utilisant une couche sacrificielle.

Les étapes 12 et 13 constituent une étape de photolithographie classique avec l'utilisation d'une résine négative (la résine non exposée est dissoute) comme couche sacrificielle. La résine est donc étalée à l'aide d'une tournette afin d'obtenir une épaisseur de 7  $\mu\text{m}$ . Un recuit à 110°C pendant 90 secondes est ensuite réalisé. Un alignement sous microscope du masque contenant les motifs des résistances est réalisé après mémorisation de la position des motifs d'alignements gravés sur le wafer. La résine est ensuite insolée pendant 90 s avant un nouveau recuit de 90 s à 110°C. Le wafer est ensuite plongé dans le bain révélateur (AZ351B / eau) puis passé au rinceur.

L'étape 14 consiste à réaliser les dépôts successifs des deux couches de métaux utilisées pour la réalisation des résistances, soit 500 Å (50 nm) de titane pour la couche d'accroche et 1 000 Å (100 nm) de platine. Avant le dépôt des couches de métaux, un décapage du substrat au plasma d'argon est réalisé afin de nettoyer correctement les trous réalisés et éviter les résidus de résine dans le fond. Les dépôts des couches de titane et de platine sont réalisés sous basse pression ( $1.10^{-2}$  mbar) respectivement pendant 1 min 15 s et 1 min 35 s sur toute la surface du wafer atteignant le substrat dans les zones gravées et se déposant sur la résine dans les zones non gravées.

L'étape 15 consiste ensuite à supprimer la couche sacrificielle. Pour cela, le wafer est plongé dans un bain d'acétone sous ultrason. Lors de la suppression de la couche sacrificielle, les couches de métaux en contact sur la résine sont arrachées. Après suppression de la couche sacrificielle, les couches de métaux restent uniquement dans les zones de contact avec le substrat. Le wafer subit ensuite différents nettoyages pour éliminer les différents résidus (bain pour les résidus de polymères comme les résines, bain eau oxygénée / acide sulfurique et bain de HF 1 %).

#### *Etape 16 : soudure anodique*

Le micro-usinage direct du silicium permet d'obtenir des structures ouvertes sur l'extérieur (sillons). La soudure anodique entre wafer est une technique qui permet de souder ensemble des substrats de silicium ou de matériaux différents (tel que le verre) afin d'obtenir des cavités closes. La solution retenue pour la réalisation de cavités closes est une soudure anodique entre le wafer de silicium (contenant les sillons) et un wafer en verre.

La soudure anodique s'effectue à une température élevée de 420°C sous vide ( $10^{-4}$  à  $10^{-5}$  mbar) et sous un champ électrique de 500 V pendant 10 min.

#### II.1.D Connexions microfluidiques

Pour permettre le remplissage des microstructures mais également la circulation des échantillons d'air, celles-ci doivent être équipées des connecteurs microfluidiques (NanoPorts) présentés précédemment.

Le procédé de mise en place des connecteurs nécessite dans un premier temps un nettoyage à l'éthanol de la surface du wafer afin d'assurer une bonne adhésion de la colle. Une fois la surface nettoyée, l'anneau de colle est positionné autour de l'orifice d'accès de la microstructure. Le joint d'étanchéité est ensuite installé sous le corps du connecteur dans une « bague » de positionnement. Le corps du connecteur est ensuite déposé sur l'anneau de colle et doit soigneusement être positionné pour permettre l'alignement des orifices du wafer et du connecteur. Une vérification de l'alignement est effectuée visuellement.

Une fois le connecteur positionné, le wafer et le corps du connecteur sont maintenus en place à l'aide d'une pince permettant ainsi la compression du joint et assurant l'étanchéité de la connexion. Une plaque de verre est préalablement placée en contact sur l'autre face du wafer (coté verre) pour éviter un contact direct entre la microstructure et la pince. L'ensemble est ensuite placé au four à 180°C pendant 2 heures.

#### II.2 CONTRAINTES EXPERIMENTALES ET OBSERVATIONS

La taille des microstructures développées dans cette étude reste relativement importante pour ce type de procédé imposant un nombre très limité de puces par wafer. En règle générale, plusieurs puces sont développées sur un même wafer afin d'obtenir un maximum de puces ne contenant pas de défaut dû aux contraintes inhérentes à l'utilisation de ce type de procédé de

fabrication. En effet, le moindre défaut tel qu'un résidu de résine peut engendrer un trou ou un défaut rendant la microstructure inutilisable.

Aussi, une attention particulière a été portée au contrôle des microstructures lors des différentes étapes du procédé, notamment lors de la photolithographie, afin de prévenir les risques de défauts.

Le processus de gravure DRIE utilisé pour la fabrication consiste à déposer une couche protectrice le long des flancs des cavités gravées, pendant que le fond est attaqué chimiquement et physiquement. Ce type de procédé permet de réaliser des gravures anisotropes profondes à fort rapport d'aspect (30 : 1 – 30  $\mu\text{m}$  de profondeur pour 1  $\mu\text{m}$  de différence d'épaisseur entre le haut et le bas). L'utilisation de cette technique de gravure a ainsi permis la réalisation de canaux de section rectangulaire sur une profondeur relativement importante de 200  $\mu\text{m}$ .

Si ce processus de gravure permet la réalisation de gravure profonde, la profondeur de la gravure n'est cependant pas illimitée. Si pour la réalisation des différents canaux des microstructures, le procédé donne des résultats très satisfaisant, en revanche, pour la création de la grille en sortie du préconcentrateur, les faibles dimensions des piliers rendent leurs fabrications délicates pour une profondeur de gravure de 400  $\mu\text{m}$ .

Une observation au microscope électronique à balayage (MEB) des piliers pour une profondeur de gravure par DRIE de 200  $\mu\text{m}$  est présentée en Figure III-9 et permet de mettre en évidence le phénomène de fragilisation du pilier pour une profondeur de gravure plus importante.

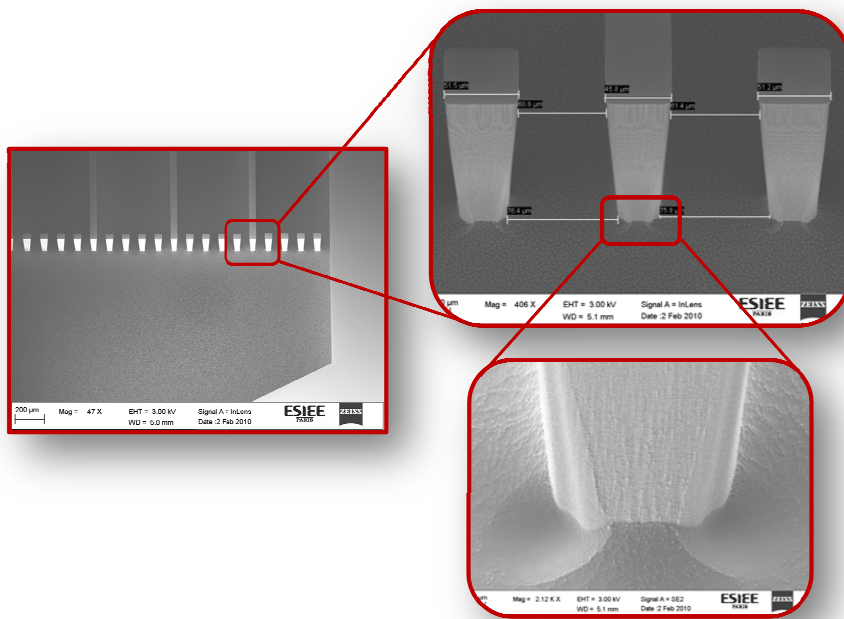


Figure III-9 : Observation de la gravure par DRIE des micropiliers

Afin d'éviter de fragiliser la résistance de la grille en sortie de la microstructure de préconcentration lors de l'insertion des grains de Tenax, le choix d'une gravure sur une profondeur moins importante a donc été retenu. La profondeur est fixée à 250  $\mu\text{m}$ .

Avant la dernière étape du procédé de fabrication consistant à réaliser une soudure anodique permettant d'obtenir des cavités closes, des clichés, réalisés au microscope électronique à balayage, permettent de contrôler la fabrication des microstructures (Figure III-10).

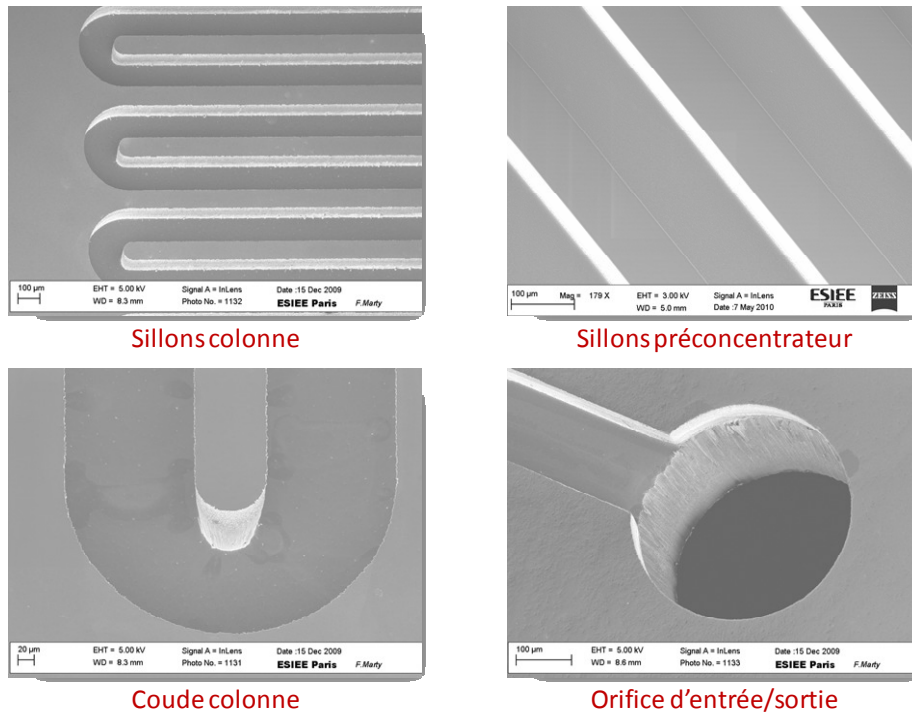


Figure III-10 : Photographie des microcanaux réalisés

## II.3 PROCEDE DE FONCTIONNALISATION DES MODULES

### II.3.A Microstructure de séparation

Une fois les microcolonnes réalisées et les connexions microfluidiques en place, celles-ci ont été fonctionnalisées avec leur remplissage par une phase stationnaire permettant l'élution et la séparation des composés gazeux.

Lors de l'analyse des COV pour le développement des indices de contamination, la séparation des différents composés a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse à l'aide d'une colonne capillaire contenant du PDMS (5 % phényl – 95 % dimethylpolysiloxane) comme phase stationnaire. Le choix d'une composition de colonne similaire, avec une phase stationnaire constituée de PDMS (Polydiméthylsiloxane), a été retenu pour la réalisation des microcolonnes.

Le PDMS utilisé (Sylgard® 184, Dow corning) est commercialisé sous forme de deux liquides, la base et le réticulant. Les deux constituants sont généralement mélangés avec un rapport massique de 10:1 (base:réticulant). Les réactions de réticulation commencent avec le mélange, induisant donc une augmentation progressive de la viscosité, suivie de la formation d'un gel. Lors du mélange, des bulles d'air sont introduites et doivent être évacuées avant de procéder au remplissage afin de permettre un dépôt uniforme sur toute la longueur de la colonne. Afin d'évacuer les bulles, le mélange est placé dans une chambre sous vide. Le temps d'évacuation varie selon la quantité d'air introduite.

Afin d'être inséré dans le micromodule et de permettre la réalisation du canal avec la substance active, à savoir la phase stationnaire, le mélange est ensuite dilué dans un solvant. Pour obtenir la meilleure efficacité possible de séparation avec une colonne chromatographique, le dépôt d'une couche homogène de phase stationnaire est nécessaire. Le



dépôt de la couche stationnaire peut alors être réalisé suivant deux méthodes, le remplissage dynamique (« dynamic coating ») ou statique (« static coating ») :

- La procédure de **remplissage dynamique** consiste à remplir de solution une partie de la colonne qui est ensuite poussé à travers la colonne, à une vitesse approximative de  $1 \text{ à } 2 \text{ cm.s}^{-1}$ , par pression d'un gaz inerte. Une fine couche de la solution est alors laissée sur les parois de la colonne. Après remplissage, le flux de gaz est maintenu pendant l'évaporation du solvant, laissant ainsi une couche de phase stationnaire sur les parois de la colonne. La colonne est chauffée au dessus du point d'ébullition du solvant afin d'éliminer les traces résiduelles de solvant. L'épaisseur du film est définie par proportion de solvant utilisé pour la dilution de la phase. Cette méthode simple pose cependant des problèmes conduisant à un dépôt non-uniforme de la phase stationnaire (Xu et Vermeulen, 1988).
- La procédure de **remplissage statique** consiste à remplir entièrement la colonne avec la solution de phase stationnaire diluée dans le solvant. Après remplissage de la colonne avec la solution, une extrémité de la colonne est bouchée et l'autre extrémité est reliée à une pompe à vide. La colonne est ensuite placée au four ou dans un bain-marie afin de contrôler la température de la colonne. L'évaporation du solvant s'effectue par application d'un vide, laissant un dépôt uniforme de phase stationnaire sur les parois de la colonne. Avec cette procédure, le ratio entre le solvant et la phase stationnaire est connu précisément et donc, en connaissant la densité de la phase stationnaire, l'épaisseur du dépôt peut être déterminée avec précision (Xu et Vermeulen, 1988).

Le choix d'un remplissage statique a été retenu pour la fonctionnalisation des microcolonnes. Le processus de fonctionnalisation des colonnes comporte donc 3 étapes :

#### *Etape 1 : Préparation de la solution*

Avec le procédé de remplissage statique, l'épaisseur de la couche de phase stationnaire dépend de la concentration de la solution et peut être déterminée par l'équation suivante dans le cas d'une colonne capillaire de section circulaire:

$$\frac{1}{4} \pi d_c^2 c = \pi d_c d_f$$

Où  $d_c$  est le diamètre interne de la colonne,  $c$  la concentration de la solution, et  $d_f$  l'épaisseur de la couche déposée, d'où :

$$c = 4 \frac{d_f}{d_c}$$

Le solvant retenu pour le remplissage de la microcolonne est le n-pentane. Ce solvant présente l'avantage d'être très volatil puisque sa température d'ébullition est de  $36,06^\circ\text{C}$  facilitant ainsi son évaporation. De plus, il est aprotique, ce qui signifie qu'il ne possède pas d'hydrogène acide (hydrogène lié à un hétéroatome tel que l'atome d'oxygène ou d'azote) susceptible de réagir avec les fonctions siloxanes (fonctions Si-O-Si du PDMS). Des solvants protiques comme l'eau ou l'éthanol conduisent à une gélification du polydiméthylsiloxane.

La microcolonne utilisée pour les essais est de section rectangulaire. Sachant que l'épaisseur souhaitée de PDMS est de 200 nm et que la microcolonne fait 200  $\mu\text{m}$  de profondeur et 150  $\mu\text{m}$  de large, le rapport  $V_{\text{PDMS}}/V_{\text{pentane}}$  a été estimé à 0,47 %.

Afin de comparer la concentration de la solution de PDMS utilisée pour la microcolonne par rapport à celle couramment utilisée dans les colonnes capillaires, un calcul a été réalisé en approximant la valeur du diamètre interne à celle de la profondeur de la microcolonne dans l'équation ci-dessus. Pour une profondeur de 200  $\mu\text{m}$ , le rapport  $V_{\text{PDMS}}/V_{\text{pentane}}$  a été estimé à 0,4 %. Cette valeur est donc cohérente avec celle calculée précédemment.

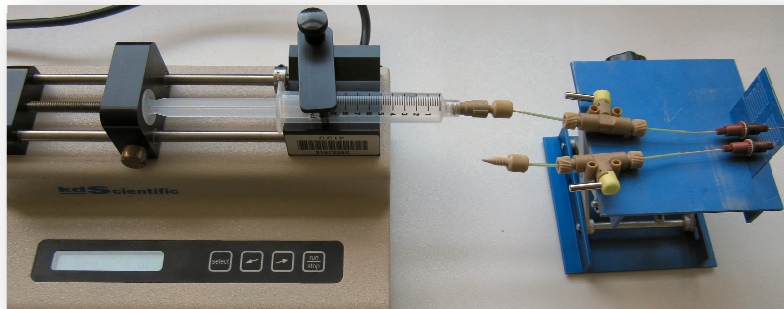
Afin de préparer la solution, ce rapport de volume est converti en un rapport de masse : Sachant que  $\rho = m / V$  où  $\rho$  est la masse volumique du composé,  $m$  la masse et  $V$  le volume, le rapport de masse équivaut à :

$$\frac{m_{\text{PDMS}}}{m_{\text{pentane}}} = \frac{\rho_{\text{PDMS}}}{\rho_{\text{pentane}}} \times \frac{V_{\text{PDMS}}}{V_{\text{pentane}}} = \frac{1,1}{0,63} \times 0,0047 = 0,0082$$

Le rapport de masse entre le PDMS et le pentane est donc de 0,82 %.

### *Etape 2 : Remplissage de la colonne*

Cette étape consiste à remplir entièrement la microcolonne de solution. Ainsi la solution de PDMS dilué dans le solvant est injectée dans la microcolonne à l'aide d'un pousse seringue. Des vannes sont installées à chaque extrémité de la colonne afin de pouvoir contrôler facilement l'ouverture et la fermeture du canal.



*Figure III-11 : Photographie du montage pour le remplissage de la colonne*

Lors du remplissage, les deux vannes sont ouvertes et la solution circule donc à travers la colonne. Une fois la colonne complètement remplie, les vannes de sortie puis d'entrée sont fermées successivement. La colonne peut ainsi être déconnectée du pousse-seringue. Avant la connexion de la colonne à la pompe à vide pour l'étape d'évaporation du solvant, le tube d'accès en entrée de la microstructure est préalablement déconnecté afin d'évacuer la solution contenue à l'intérieur du tube. La formation d'un ménisque est observée en entrée de la microstructure (Figure III-12). Ce ménisque correspond à la surface de la solution (PDMS dilué dans le pentane) où se produit l'évaporation du solvant. Celui-ci permettra donc par la suite de contrôler l'évaporation du solvant.

La concentration de la solution joue également un rôle important dans cette étape du procédé. En effet, dans le cas d'une dilution trop faible du PDMS dans le solvant, la paroi du ménisque forme une membrane ne permettant pas l'évaporation du solvant.

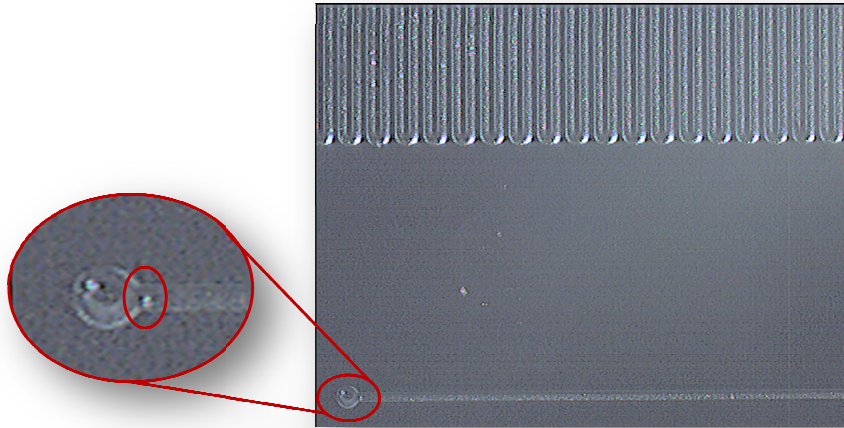


Figure III-12 : Observation d'un ménisque lors de la déconnexion du tube

Etape 3 : Evaporation du solvant et fonctionnalisation

Une fois le tube d'accès en entrée de la colonne reconnecté, la pompe à vide peut être connecté à la colonne. Un raccord en T est inséré entre la vanne d'entrée et la pompe afin de créer une fuite contrôlée par une bague permettant ainsi de contrôler le vide appliqué dans la colonne. L'étanchéité au niveau des connexions entre les éléments du montage est un paramètre important afin d'assurer la continuité lors du processus d'évaporation du solvant. Une fois connectée, la microcolonne est alors mise en contact sur une plaque chauffante régulée en température permettant de contrôler la température appliquée à la microstructure. Un schéma du montage est présenté en Figure III-13 :

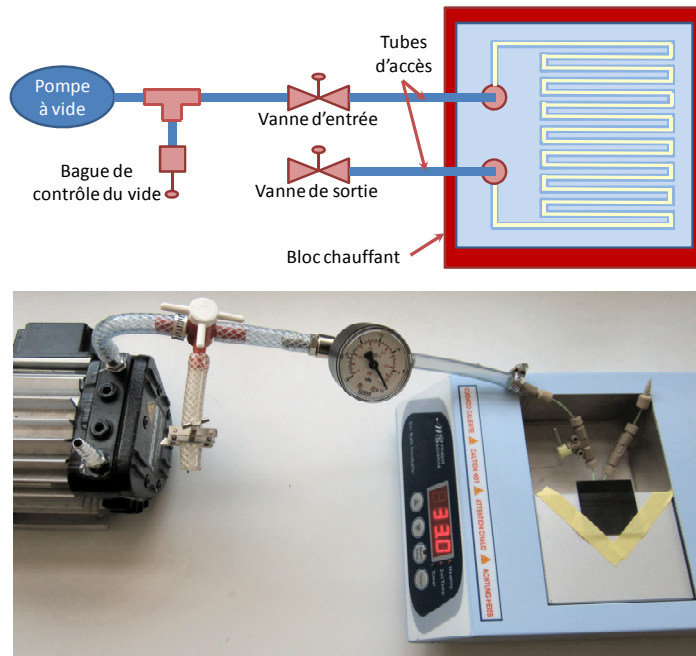


Figure III-13 : Schéma et photographie du montage pour l'évaporation du solvant

Lors de la mise en contact de la microstructure un léger déplacement du ménisque est observé suite à la dilatation du solvant due au changement de température. En effet, lors d'un procédé

de remplissage statique, la chaleur extérieure est transférée au ménisque ce qui permet l'évaporation du solvant. La vapeur du solvant ainsi créée, ayant une pression supérieure à celle de l'orifice de la colonne, traverse la colonne vers la sortie. Une schématisation du phénomène est proposée Figure III-14 :

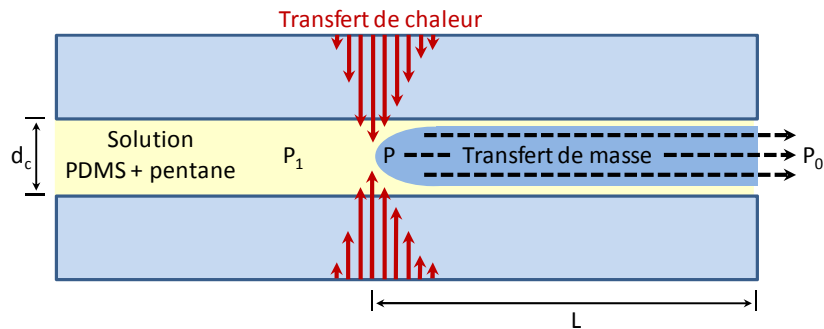


Figure III-14 : Schéma descriptif de l'évaporation d'un fluide dans un canal

Dans ce procédé, les deux principaux facteurs sont le transfert de masse (vapeur de solvant) vers la sortie et le transfert de chaleur dans la colonne. De la loi de Poiseuille découle l'équation qui régit ce phénomène physique :

$$\frac{dV}{dt} = \frac{\pi d_c^4 (P^2 - P_0^2)}{256 L \eta_v P_{atm}}$$

Où  $dV / dt$  est le débit d'évaporation du solvant,  $P$  et  $P_0$  sont respectivement les pressions au niveau du ménisque et à la sortie de la colonne,  $\eta_v$  la viscosité de la vapeur du solvant,  $L$  la distance entre le ménisque et la sortie de la colonne,  $P_{atm}$  la pression atmosphérique et  $d_c$  le diamètre interne de la colonne.

Cette équation permet de mettre en évidence que le débit d'évaporation du solvant à travers la colonne est proportionnel au terme  $P^2 - P_0^2$  et inversement proportionnel à  $L$ . De l'équation précédente est déduite l'équation régissant la vitesse de remplissage :

$$\frac{dL}{dt} = \frac{273,16 d_c^2 (P^2 - P_0^2) M}{64 \cdot 22400 T_c L \eta_v d_1 P_{atm}}$$

Où  $dL / dt$  est la vitesse de remplissage,  $M$  la masse molaire du solvant,  $T_c$  la température de remplissage et  $d_1$  la densité du solvant.

Dans un procédé de remplissage statique conventionnel,  $P$  est généralement faible et par conséquent la vitesse de remplissage  $dL / dt$  est également faible, en particulier quand la colonne à remplir est longue ou que son diamètre interne est faible. Lors de l'utilisation d'une température de remplissage élevée, le terme  $P^2 - P_0^2$  peut être grand malgré le fait que  $P_0$  soit grand également. Cependant, l'utilisation de température élevée entraîne une différence entre la tension de vapeur  $P_l$ , pression d'équilibre entre la phase liquide et la phase vapeur de la solution, et  $P$  la pression au niveau du ménisque qui sera plus élevée. Ce phénomène risque d'augmenter la formation de bulles conduisant à une fonctionnalisation de la colonne inhomogène.

Afin d'augmenter la vitesse de remplissage, une pompe à vide est connectée en sortie de la colonne. Celle-ci permet de diminuer la valeur de  $P_0$  favorisant ainsi le transfert de masse.

Les conditions initiales du procédé d'évaporation sont donc les suivantes : la pompe à vide (éteinte) est connectée à la vanne d'entrée (fermée) avec l'insertion de la bague de contrôle (voir Figure III-13). La vanne de sortie est également fermée. Dans un premier temps, la pompe est allumée avec la bague de contrôle ouverte afin de créer une fuite. La vanne

d'entrée est ensuite ouverte et la bague de contrôle fermée progressivement afin de créer un vide progressif dans la colonne. Une mesure du vide est réalisée en amont de la vanne d'entrée.

Dans notre cas, l'évaporation du solvant débute pour un vide d'environ 0,2 bars et la température de la colonne est maintenue à 33°C. La progression du ménisque, formé par l'évaporation du solvant, permet de suivre la progression du dépôt. Le ménisque se déplace donc dans la colonne de l'entrée vers la sortie comme l'illustre la Figure III-15 :

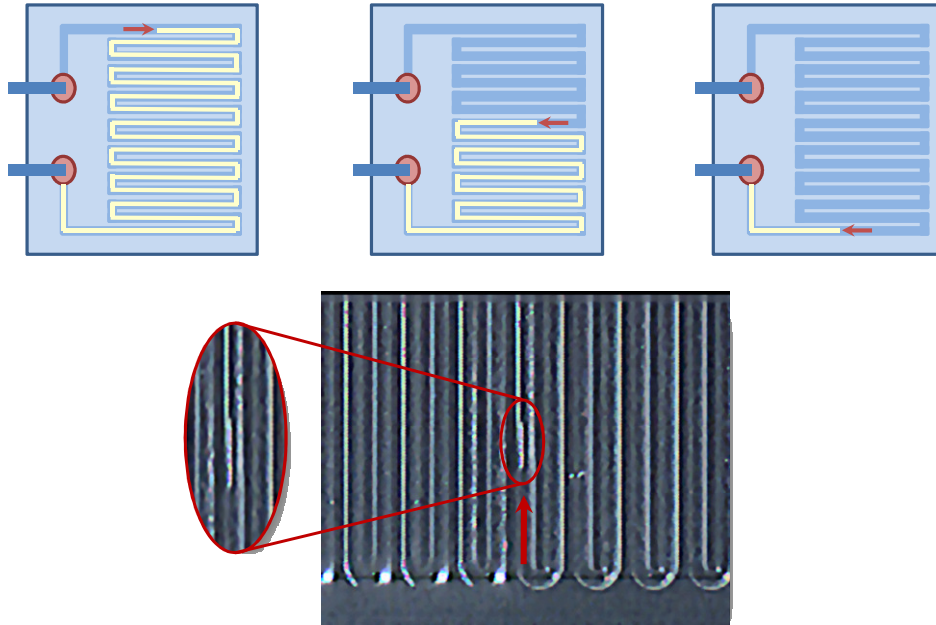


Figure III-15 : Progression du ménisque à travers la microcolonne

Le procédé d'évaporation dure environ 15 min soit une vitesse d'environ  $0,5 \text{ cm.s}^{-1}$ . Une fois le ménisque arrivé en sortie de la colonne, le vide est maintenu pendant quelques minutes afin de permettre l'évaporation du solvant contenu dans le tube de sortie. Le vide est ensuite progressivement cassé à l'aide de la bague de contrôle.

La dernière étape pour fonctionnaliser la microcolonne consiste à placer la colonne dans un four à 80°C pendant 2 heures afin de réticuler la couche de PDMS déposé sur les parois.

Le réglage des paramètres environnementaux que sont la température et le vide appliqué à la microcolonne dans le processus d'évaporation du solvant sont délicats à obtenir. En effet, une température trop faible (inférieure à 31°C) ne permet pas l'évaporation du solvant alors qu'une température trop élevée (supérieure 35°C, soit environ la température d'ébullition du solvant) entraîne une discontinuité de l'évolution du processus d'évaporation à travers la colonne. Le choix d'une température de 33°C a donc été retenu, cependant le processus d'évaporation reste sensible à la température.

L'utilisation d'un vide contrôlé permet de pallier ce problème. En effet, si trouver la température adéquate reste délicat, une fois la température de la microstructure stabilisée, la gestion du vide appliqué dans la colonne permet de contrôler la vitesse d'évaporation du solvant. Une augmentation progressive du vide permet ainsi d'une part de débiter le processus d'évaporation (0,2 bars dans cette étude) et d'autre part d'en contrôler la vitesse (plus le vide est important, plus la vitesse d'évaporation augmente).

La Figure III-16 présente une photographie de la microstructure de séparation ainsi que des images des canaux réalisées sous loupe binoculaire.



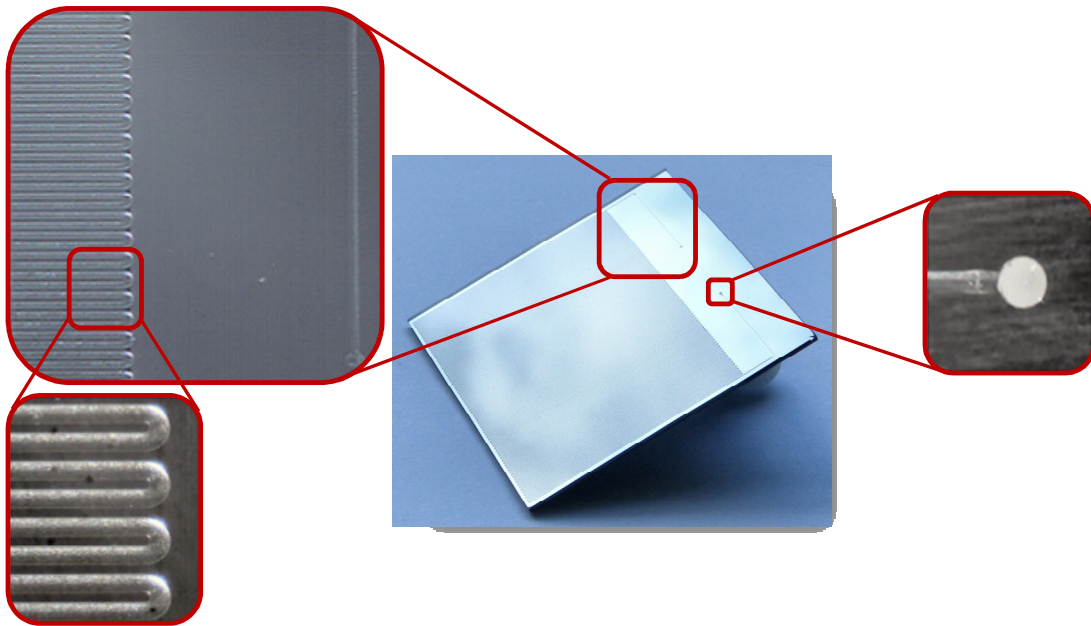


Figure III-16 : Photographie de la microstructure de séparation

### II.3.B Microstructure de concentration.

Le développement des indices de contamination fongique a permis d'identifier le Tenax TA comme un adsorbant pertinent pour piéger les molécules sélectionnées pour la détection fongique. Ce matériau est disponible sous forme de grain dont la taille a été sélectionnée à l'aide de tamis pour obtenir des diamètres compris entre 50 et 100  $\mu\text{m}$ .

Le matériau étant sous forme de grain, celui-ci est donc dilué dans un solvant afin de pouvoir être introduit dans la microstructure à l'aide d'un pousse-seringue. Le procédé de remplissage pour la microstructure de concentration est moins complexe que pour la fonctionnalisation de la microcolonne. Néanmoins, une phase d'optimisation de la fonctionnalisation de la microstructure par l'insertion des grains de Tenax à l'intérieur du dispositif est nécessaire. Les paramètres de dilution et de débit d'insertion sont notamment à définir afin d'éviter des risques de colmatage du canal d'accès à la structure ou de destruction de la microstructure.

Le solvant retenu pour la fonctionnalisation de la microstructure de concentration est l'éthanol. Pour le paramètre de dilution, le rapport entre le volume de Tenax et le volume d'éthanol ( $V_{\text{Tenax}}/V_{\text{Ethanol}}$ ) est estimé entre 1 et 2 %.

Le processus de remplissage de la microstructure de concentration consiste donc à injecter *via* le pousse-seringue les grains de Tenax dilués dans l'éthanol. Un aimant, inséré dans la seringue, couplé au micro-agitateur permet de maintenir en suspension les grains dans le solvant. Ceci permet de pallier le problème de sédimentation des grains de Tenax dans le fond de la seringue. Les grains transportés par le solvant sont ainsi injectés les uns après les autres dans la structure. La microstructure, en position verticale, permet aux grains de s'écouler dans la structure vers la sortie. La présence de la grille constituée des micropiliers en sortie de la structure permet alors de filtrer les grains. Une photographie du montage réalisé pour la fonctionnalisation de cette microstructure est présentée en Figure III-17.

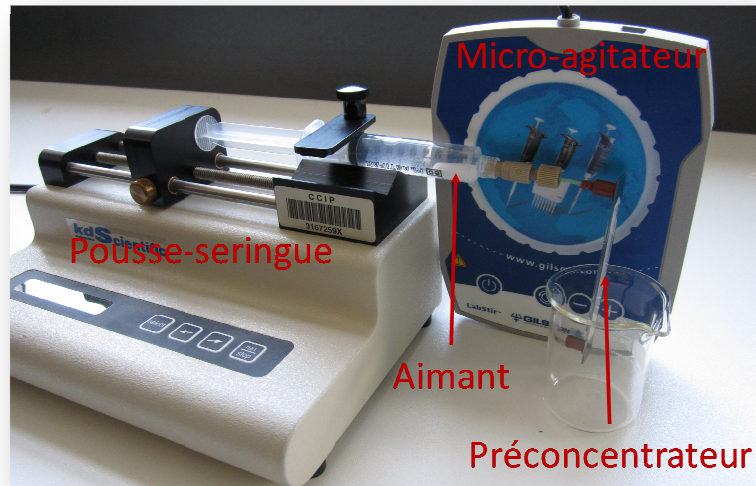
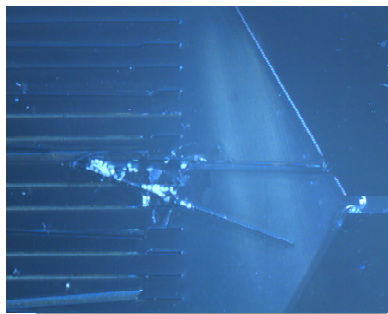


Figure III-17 : Photographie du montage de fonctionnalisation du préconcentrateur

L'utilisation d'un pousse seringue permet de contrôler le débit de remplissage et donc de réguler l'injection des grains dans la structure via le canal d'accès. Un débit de remplissage trop important peut cependant conduire à la destruction partielle des murs formant les canaux (Figure III-18a) ou encore à la formation d'une fissure sur la face arrière de la structure (Figure III-18b) :



(a)



(b)

Figure III-18 : Photographie de la destruction d'un mur (a) et d'une fissure (b)

Le choix d'un débit de  $250 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  pour le remplissage de la microstructure a été retenu. Celui-ci permet d'éviter, d'une part le colmatage du canal d'accès par les grains injectés dans la structure, d'autre part, de ne pas soumettre la microstructure à de trop fortes contraintes, notamment en fin du remplissage de la structure.

Le principal problème rencontré avec l'utilisation de ce processus, est la présence de microfibre pouvant se mélanger à la solution lors de la dilution des grains dans l'éthanol. La présence d'une fibre dans un canal peut conduire à l'obstruction de celui-ci, empêchant donc son remplissage. La Figure III-19 présente une photographie de la présence d'une fibre dans un canal.

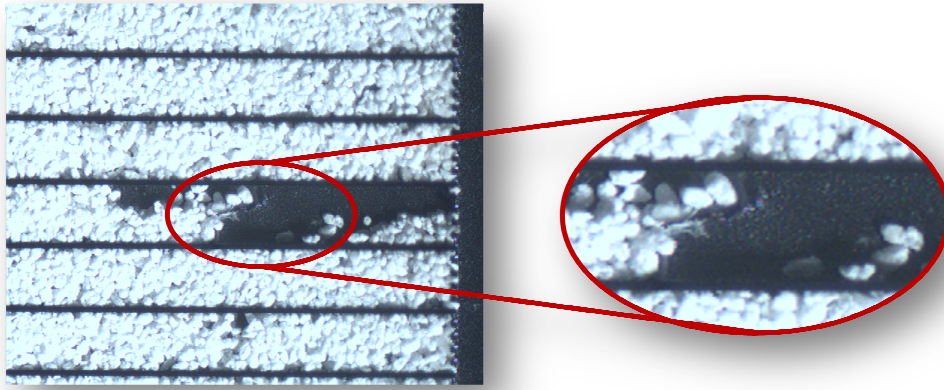


Figure III-19 : Présence d'une fibre dans un canal du préconcentrateur

Une fois la microstructure complètement remplie, celle-ci est placée au four à 100°C pendant 2 heures afin d'éliminer les traces résiduelles de solvant, puis conditionnée pendant deux heures à 140°C avec un passage d'air filtré à travers la structure. La Figure III-20 présente une photographie de la microstructure de concentration ainsi que des images des canaux remplis de Tenax réalisées sous loupe binoculaire.

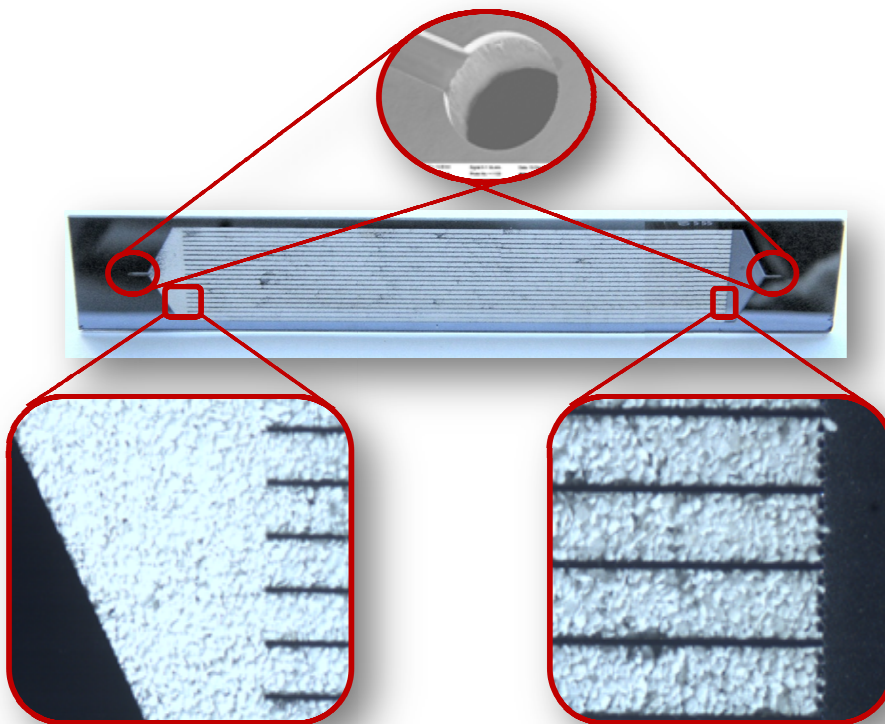


Figure III-20 : Photographie de la microstructure de concentration

#### II.4 PROCEDE DE FABRICATION DU MODULE DE DETECTION

Le système d'acquisition de données, utilisé lors des tests sur les capteurs polymères conducteurs, ne permet pas une intégration pour la réalisation d'une microchaîne d'analyse des COV d'origine fongique. Dans cette optique, un module de détection, basé sur la matrice de polymères composant le cœur du système d'acquisition, a été réalisé. Ainsi, le module de détection se compose de 4 paires d'électrodes interdigitées pour les dépôts des couches



polymères, et d'une chambre en acier inoxydable permettant le confinement des couches polymères et le passage de l'air.

#### II.4.A Electrodes interdigitées

La carte utilisée précédemment dans le système d'acquisition, ne permet pas de réaliser simplement et précisément des dépôts.

D'une part, sa configuration et la méthode de dépôt des différents polymères imposent de déposer le même polymère sur toutes les électrodes. En effet, des dépôts successifs d'autres polymères ou électrolytes ainsi que le dopage chimique (vapeur de diiode) altèrent les dépôts précédents et ne permettent donc pas de comprendre le mécanisme d'interaction uniquement entre le COV et le polymère. D'autre part, la configuration des électrodes utilisées ne permet pas un contrôle de la zone de dépôt du polymère entre les deux électrodes.

Des « puces » indépendantes constituées d'une unique paire d'électrodes interdigitées ont ainsi été développées pour pallier ces inconvénients. Comme pour la carte précédente, les électrodes sont réalisées en or avec une couche d'accroche en chrome. Le procédé de réalisation est présenté en Figure III-21.

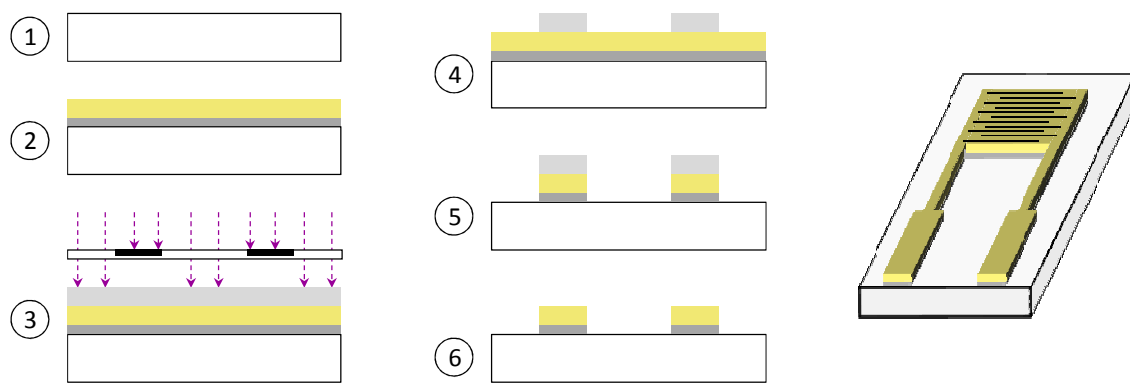


Figure III-21 : Représentation schématique du procédé de fabrication des électrodes interdigitées

##### *Etape 1 : Nettoyage du wafer*

Le nettoyage est identique à celui utilisé pour la réalisation des précédents modules.

##### *Etape 2 : Le dépôt des couches de chrome et d'or*

Pour la réalisation des électrodes, le procédé consiste à déposer successivement de manière homogène la couche d'accroche en chrome sur une épaisseur de 500 Å (durée de dépôt de 1 min 15), puis la couche d'or sur une épaisseur de 10 000 Å (durée de dépôt 10 min). Les dépôts sont réalisés par pulvérisation cathodique à température ambiante (24°C) dans un plasma d'argon.

Les étapes suivantes consistent à définir les zones de gravure pour la réalisation des motifs. Ces étapes comportent donc une phase de photolithographie UV classique puis une gravure humide des couches de chrome et d'or.

##### *Etapas 3 et 4 : définition des zones de gravure*

Une fois les couches déposées, le procédé consiste à réaliser une étape de photolithographie classique permettant.

L'étape 3 consiste donc à déposer une couche de résine photosensible (résine positive PFR 7 790) à l'aide d'une tournette. L'épaisseur voulue est de 1,2  $\mu\text{m}$  (vitesse de rotation de 4 500  $\text{tr}\cdot\text{min}^{-1}$ , accélération de 2 000  $\text{tr}\cdot\text{min}^{-2}$  pendant 30 s). Le recuit de la résine est réalisé sur plaque chauffante (« hot plate ») à 110°C pendant 3 min. L'étape de photolithographie est ensuite effectuée avec un temps d'insolation de la résine fixé à 10 s et une puissance de la lampe de 345 W. Une image du masque utilisé lors de l'insolation est présentée en Figure III-22.

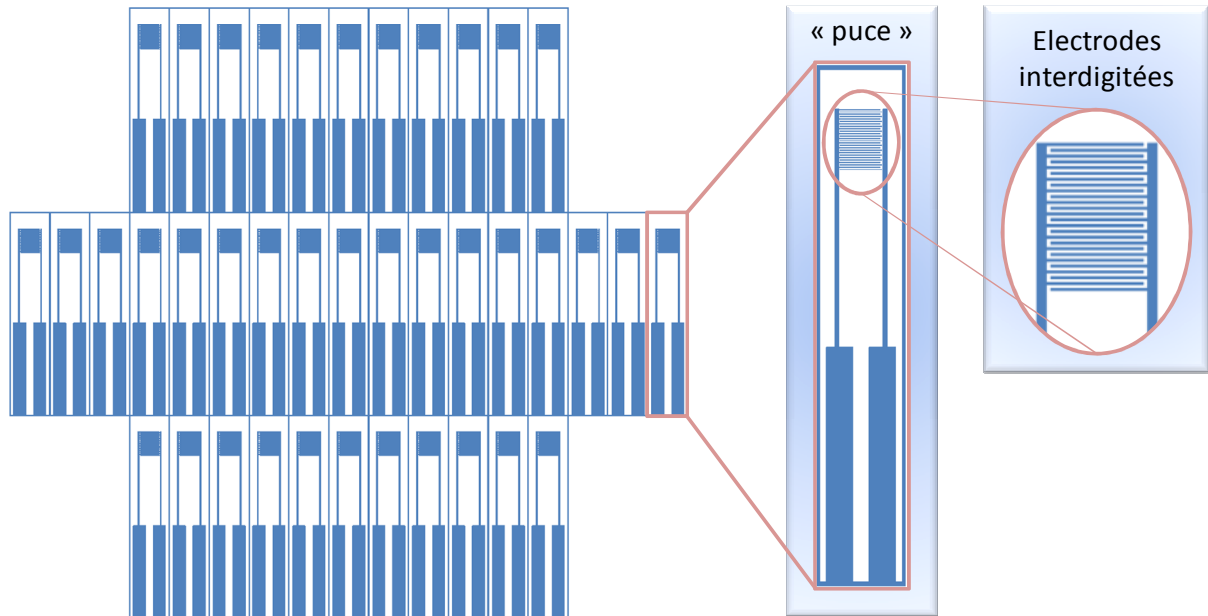


Figure III-22 : Représentation du masque pour la réalisation des puces contenant les électrodes interdigitées

Les caractéristiques géométriques retenues pour la réalisation des puces contenant une paire d'électrodes interdigitées sont reportés dans le Tableau III-7.

Tableau III-7 : Caractéristiques géométriques (en  $\mu\text{m}$ ) des électrodes

Carte		Contact			Electrodes interdigitées			
longueur	largeur	longueur	largeur	pas	longueur	largeur	pas	nombre
26000	5080	12000	1580	2540	2500	60	240	13

L'étape 4 consiste ensuite à développer la résine formant ainsi les motifs gravés ultérieurement. Le wafer est donc plongé dans le bain révélateur (PRD 238) pendant 1 min 10 s. Le wafer développé est ensuite rincé à l'eau déionisée pendant 3 min et séché avant le deuxième recuit post développement, permettant ainsi de durcir complètement la résine. Cette étape de recuit est effectuée en étuve à 100°C pendant 15 min. Le wafer est de plus nettoyé à l'aide d'un plasma  $\text{O}_2$  afin d'éliminer les résidus de résine (notamment le fond des trous gravés) après le développement et améliorer la netteté des trous dans la résine.

#### Etape 5 : gravure des couches de chrome et d'or

Les gravures de l'or puis du chrome sont réalisées dans des solutions chimiques composées d'acides. Les solutions sont maintenues à une température de 30°C.

Le premier bain est réalisé dans une solution permettant la gravure de la couche d'or. Le contrôle de la gravure s'effectue visuellement jusqu'à élimination totale de la couche d'or dans les zones délimitées par la résine. Le wafer est ensuite rincé dans l'eau déionisée.

Le deuxième bain est réalisé dans une solution permettant la gravure de la couche de chrome. Le contrôle de la gravure s'effectue visuellement jusqu'à élimination totale de la couche de chrome dans les zones délimitée par la résine. Le wafer est ensuite rincé dans l'eau déionisée.

Un nouveau bain très rapide est ensuite réalisé pour la gravure de l'or et du chrome à l'interface des deux couches. Le wafer est ensuite rincé dans l'eau déionisée.

#### *Etape 6 : suppression de la couche de résine*

Une fois les couches gravées, le wafer est plongé dans l'acétone afin de supprimer la couche de résine restante et le wafer est ensuite passé au rinceur.

Une fois le procédé de fabrication de cartes terminé, une couche de résine d'épaisseur 3  $\mu\text{m}$  est de nouveau déposée sur toute la surface du wafer afin d'éviter des dépôts de particule sur les électrodes lors de la découpe des différentes cartes présentes sur le wafer. La résine est ensuite recuite à 110°C pendant 1 min 30 s sur plaque chauffante. Avant d'utiliser les cartes pour les fonctionnaliser avec un polymère conducteur, un bain dans l'acétone permet l'élimination de la couche de protection en résine.

#### II.4.B Chambre de confinement

Comme pour le système de test, l'utilisation des capteurs polymères nécessite le développement d'une chambre permettant le confinement des couches sensibles afin de les exposer uniquement aux échantillons d'air circulant dans le système. Le choix de l'acier inoxydable comme matériau pour la réalisation de cette chambre et l'utilisation de joint en téflon (PTFE) permet de limiter la génération d'un bruit de fond, l'acier inoxydable et le téflon étant des matériaux non émissifs dans les conditions expérimentales de cette étude. Les caractéristiques géométriques de la chambre réalisée pour permettre l'utilisation des électrodes développées précédemment sont présentées Figure III-23.

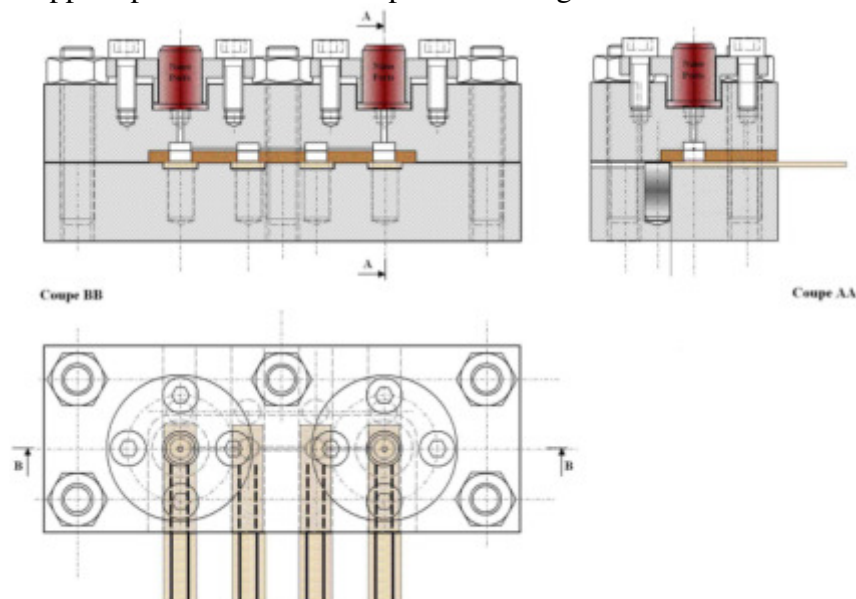


Figure III-23 : Plan de fabrication de la chambre de confinement

La chambre de confinement se divise donc en deux parties. Une partie socle dans laquelle sont creusées quatre sillons permettant l'insertion des électrodes. Une butée permet de placer la zone de dépôt du polymère présent sur l'électrode en face des « volumes » de confinement présent sur la partie capot.

La partie capot est donc constituée de quatre volumes de confinement liés entre eux par un canal. Ces volumes de confinement permettent donc d'englober uniquement la zone de dépôt des polymères et ainsi de limiter la dilution des échantillons dans des volumes trop importants. Afin d'assurer l'étanchéité entre l'électrode et les volumes de confinement, un joint téflon est inséré dans une gorge entre les deux éléments. Le joint présente ainsi quatre ouvertures permettant d'exposer les échantillons d'air présent dans les volumes de confinement aux couches sensibles des électrodes.

Enfin, la circulation des échantillons d'air est assurée en entrée et en sortie de la chambre sur la partie capot à l'aide de NanoPort.

La Figure III-24 présente des photographies des différentes pièces de la chambre de confinement.

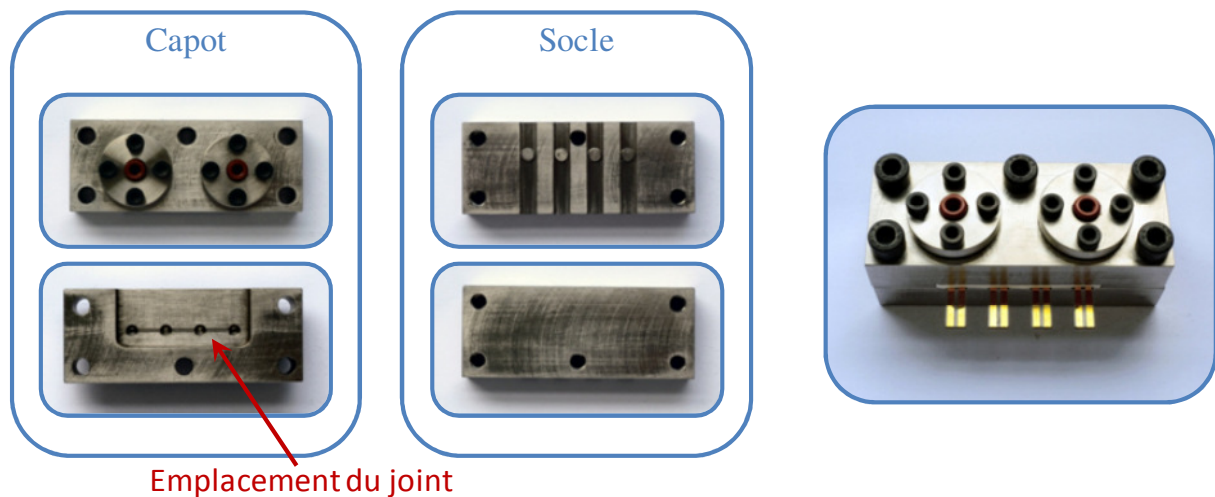


Figure III-24 : Photographie de la chambre de confinement des capteurs polymères

Les dimensions et l'espace entre chaque capteur a été défini afin de pouvoir utiliser un connecteur encartable avec un pas de 2,54 mm. Ce connecteur permet ainsi de réaliser la liaison entre les capteurs et une carte de traitement de l'information.

#### II.4.C Traitement de l'information

Les capteurs fonctionnalisés avec un polymère conducteur sont placés dans la chambre de confinement afin de pouvoir être utilisé comme module de détection du système d'analyse. Le principe de fonctionnement de ces capteurs est basé sur la variation de conductivité du polymère induite par l'adsorption de composés gazeux à sa surface. Cette adsorption dépend de l'affinité du composé avec le site actif présent dans le polymère.

Afin de convertir cette variation de conductivité en un signal mesurable, le capteur est placé dans un montage permettant de mesurer une variation de résistance électrique nommé « Pont de Wheatstone ». Le principe de ce montage consiste à équilibrer les deux branches du pont en plaçant le capteur dans une des deux branches. Les variations de résistivité du capteur engendrent un déséquilibre et l'apparition d'une tension entre les deux branches du pont (Figure III-25).

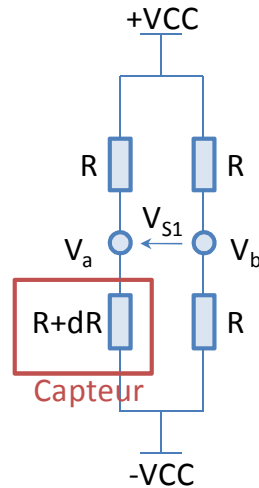


Figure III-25 : Schéma d'un montage « Pont de Wheastone »

Dans ce montage,  $dR$  représente la variation de résistivité du capteur lors de l'adsorption de composés gazeux à sa surface. La valeur de la tension de sortie  $V_{S1}$  est définie par les éléments du montage et vaut :

$$V_{S1} = \frac{VCC}{2} \frac{dR}{R}$$

Lorsque toutes les résistances sont égales ( $dR = 0$ ), la valeur de  $V_{S1}$  est égale 0. Lorsque la résistivité du capteur varie ( $dR \neq 0$ ), alors  $V_{S1}$  est l'image de cette variation et peut-être amplifiée à l'aide d'un montage amplificateur utilisant un amplificateur opérationnel (Figure III-26).

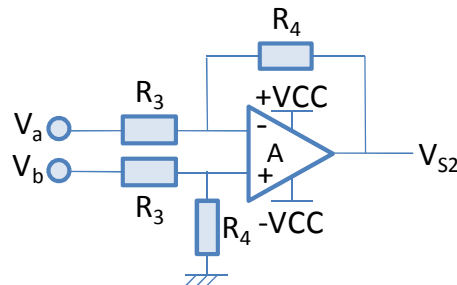


Figure III-26 : Schéma d'un montage amplificateur

Ce montage permet d'amplifier la tension comprise entre  $V_a$  et  $V_b$  (soit  $V_{S1}$ ) en fonction de la valeur des résistances composant le montage :

$$V_{S2} = \frac{R_4}{R_3} (V_b - V_a)$$

La tension de sortie du montage représentant les variations de résistivité du capteur devient alors :

$$V_s = \frac{R_4}{R_3} (V_b - V_a) = -V_{S1} \frac{R_4}{R_3} = -\frac{VCC}{2} \frac{dR}{R} \frac{R_4}{R_3}$$

Dans cette optique, une carte permettant de traiter les informations transmises par les capteurs a été développée. Elle consiste à associer à chaque capteur, un pont de Wheaston pour convertir la variation de résistivité en tension et un montage amplificateur (Figure III-27).

## Deuxième partie : Conception des micromodules du système d'analyse

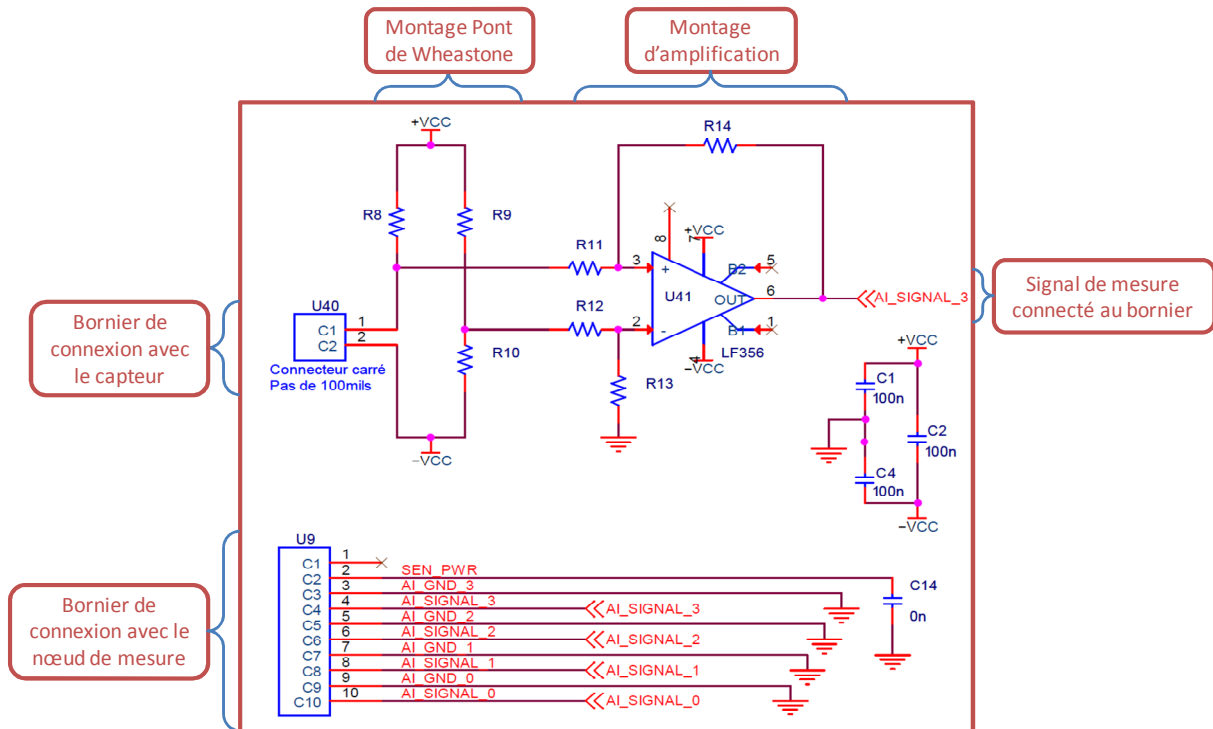


Figure III-27 : Montage de traitement des informations des capteurs

Le schéma du montage développé sous Cadence Allegro Design Entry représente un des quatre montages utilisés pour le traitement de chacun des capteurs. Un bornier regroupe les signaux de mesure des différents capteurs et permet la connexion avec un nœud de mesure pour permettre à l'utilisateur de récupérer les informations transmises.

L'ensemble des quatre montages et du bornier forment ainsi une carte de traitement des signaux des différents capteurs. Cette ensemble peut alors être intégré à l'aide de l'outil cadence Allegro PCB Design pour développer la carte. Cet outil permet le placement et le routage entre les différents composants de la carte en intégrant toutes les liaisons définies sous Cadence Allegro Design Entry. La carte de traitement des signaux transmis par les capteurs peut alors être réalisée (Figure III-28).

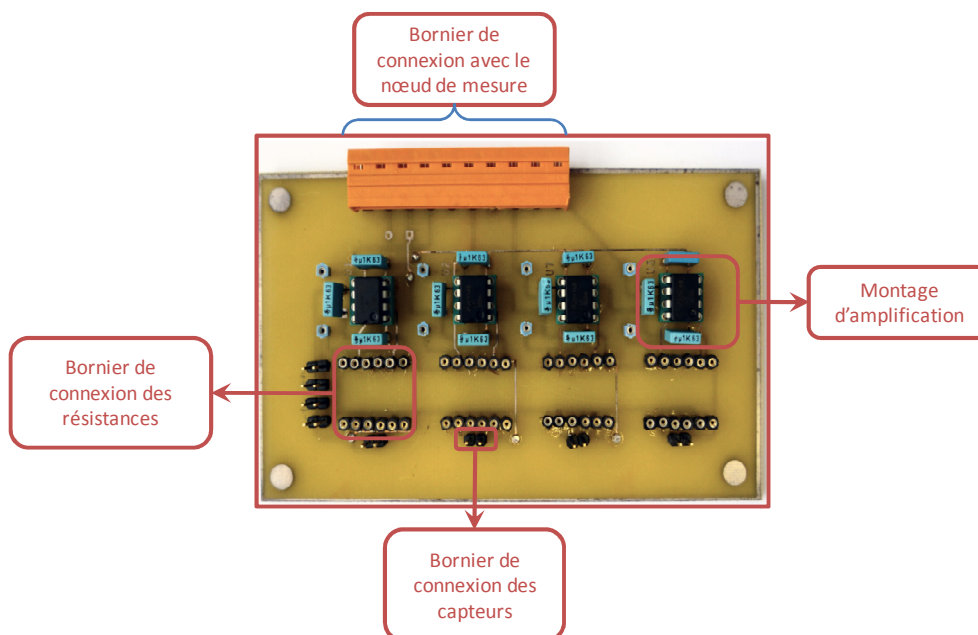


Figure III-28 : Photographie de la carte de traitement des signaux des capteurs

## II.5 CARACTERISATION DES MODULES

### II.5.A Module de concentration de l'échantillon

Dans un premier temps, un volume d'1  $\mu\text{L}$  de solution mère avec 8 traceurs a été injecté en mode split (1/25). Ainsi, les 8 traceurs présents dans la solution ont pu être séparés et identifiés avec des temps de rétention différents allant de 3,97 à 8,35 min (Figure III-29). Les pics des 2 isomères (2-méthyl-1-butanol et 3-méthyl-1-butanol) sont coélués. L'éthanol (solvant) sortant durant les 3,5 premières minutes, le début de l'analyse a été fixé à 3,8 min. En fixant ce délai, une usure prématurée du filament de la source est évitée.

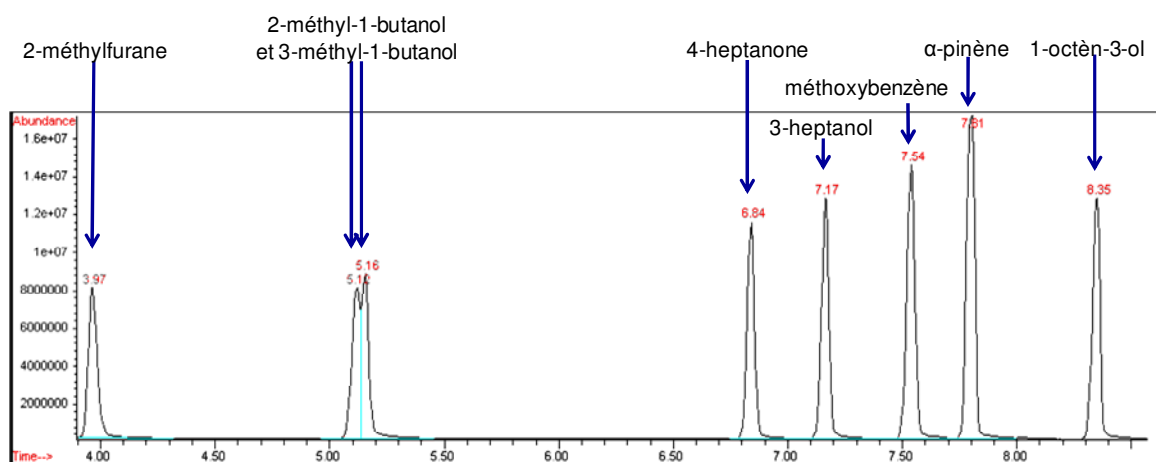


Figure III-29 : Chromatogramme obtenu à partir de la solution mère contenant les 8 traceurs (Chaîne Hewlett Packard - mode SCAN)

Après obtention des temps de rétention des traceurs avec le mode scan, des essais ont été réalisés à partir des échantillons prélevés avec les préconcentrateurs. Cependant, avec une injection de 5  $\mu\text{L}$  (maximum de l'injecteur) et les phénomènes de dilution créés lors des différentes étapes de prélèvement, les composés ne se différencient pas du bruit de fond (Figure III-30).



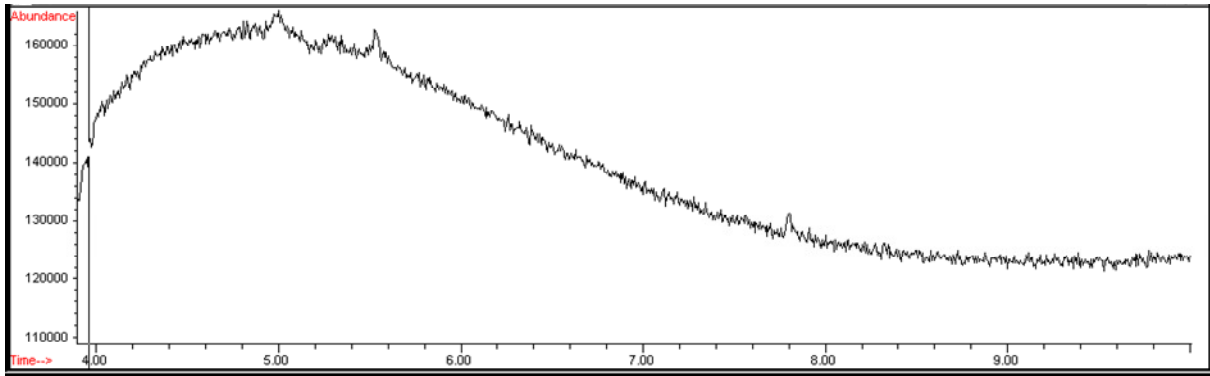


Figure III-30 : Chromatogramme des émissions de la chambre contenant les 8 traceurs (Chaîne Hewlett Packard - mode SCAN)

Les mêmes types de chromatogrammes ont été obtenus avec les ambiances contaminées par des moisissures (Figure III-31).

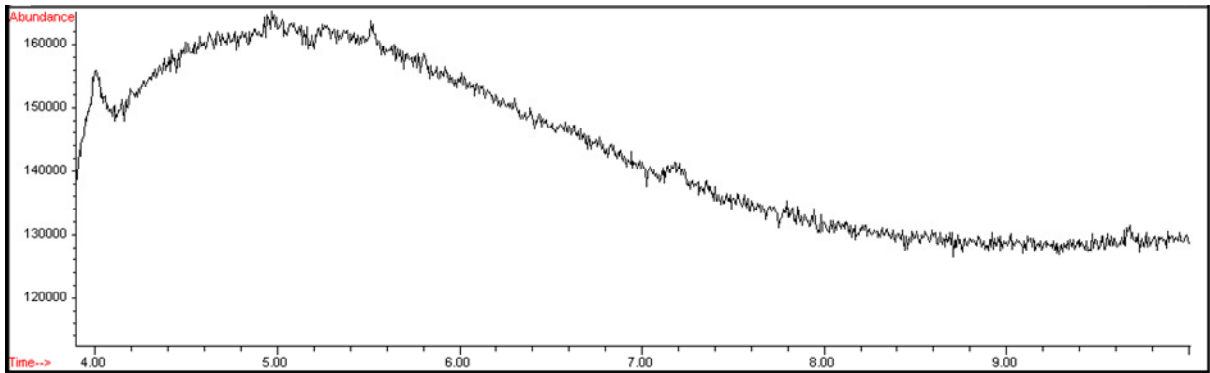


Figure III-31 : Chromatogramme des émissions de la chambre contenant de la toile de verre contaminée par *Aspergillus niger* (Chaîne Hewlett Packard - mode SCAN)

Etant donné les faibles concentrations des vials, les échantillons ont été repassés en mode SIM (Figure III-32). Sept pics ont été retrouvés et ont pu être identifiés. Comme précédemment, les 2 isomères (2-méthyl-1-butanol et 3-méthyl-1-butanol) sont coélués. Un piégeage et une désorption de l'ensemble des traceurs testés sont donc constatés.

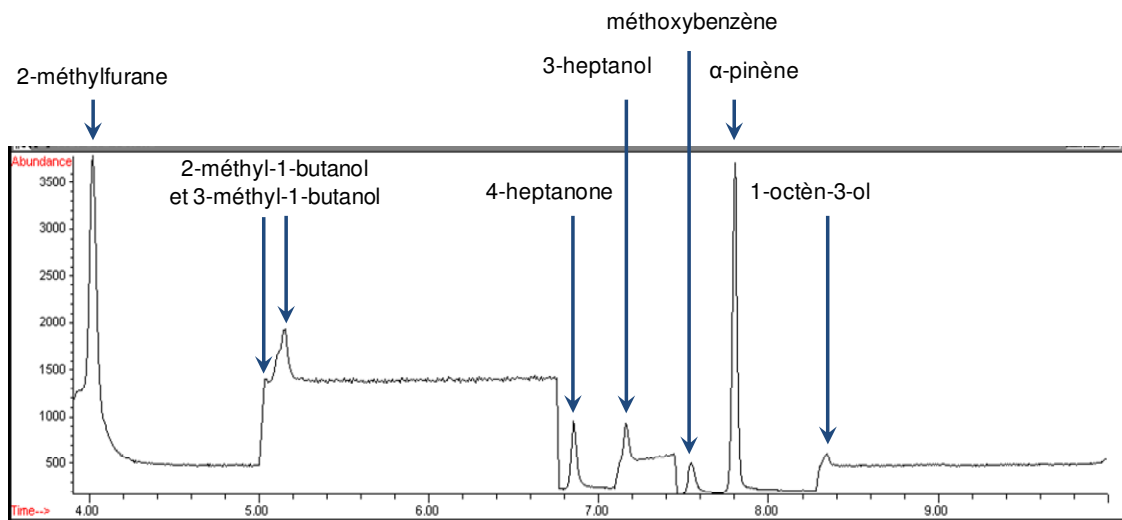


Figure III-32: Chromatogramme des émissions de la chambre contenant les 8 traceurs (Chaîne Hewlett Packard - mode SIM)



Les 8 traceurs ont été retrouvés avec les ambiances contaminées par des moisissures, mais les concentrations observées sont plus faibles (Figure III-33).

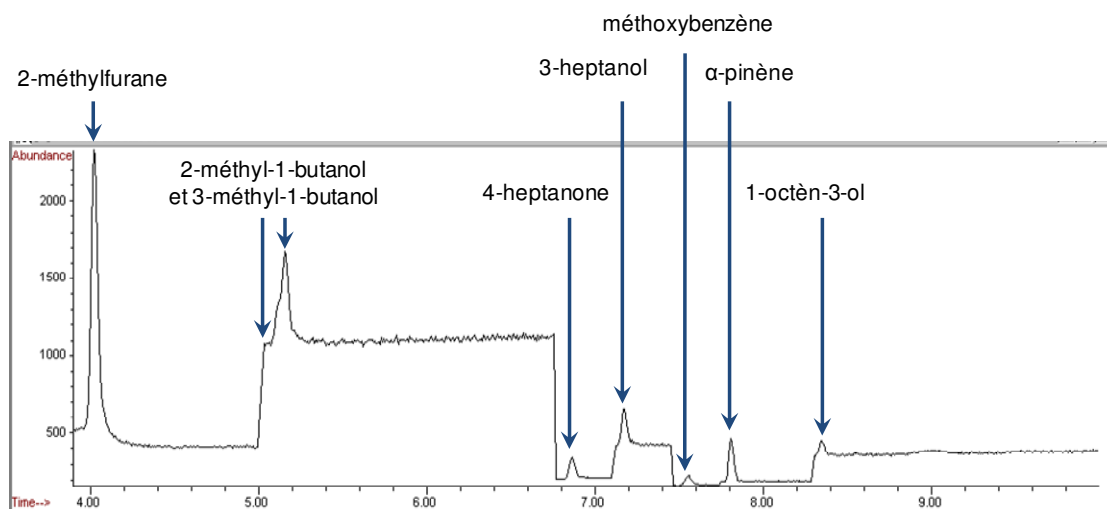


Figure III-33 : Chromatogramme des émissions de la chambre contenant de la toile de verre contaminée par *Aspergillus niger* (Chaîne Hewlett Packard - mode SIM)

La répétabilité de ces résultats a été vérifiée avec trois mesures successives. Ainsi, les résultats obtenus permettent de valider à la fois le piégeage des composés et leur désorption à 140°C.

#### II.5.B Module de séparation de l'échantillon

Des essais ont été réalisés successivement sur 2 microcolonnes qui seront notées microcolonne n°1 et microcolonne n°2 selon leur ordre de remplissage. Concernant la microcolonne n°1, 5 traceurs présents dans la solution ont pu être séparés avec des temps de rétention différents allant de 1,67 à 6,77 min (Figure III-34). Les 5 produits, à savoir le 2-méthyl-1-butanol ( $t_r$  : 1,67 min), la 4-heptanone ( $t_r$  : 2,77 min), le méthoxybenzène ( $t_r$  : 3,43 min), l'alpha-pinène ( $t_r$  : 3,62 min) et enfin le 1-octèn-3-ol ( $t_r$  : 6,77 min) ont été identifiés via le spectromètre de masse.

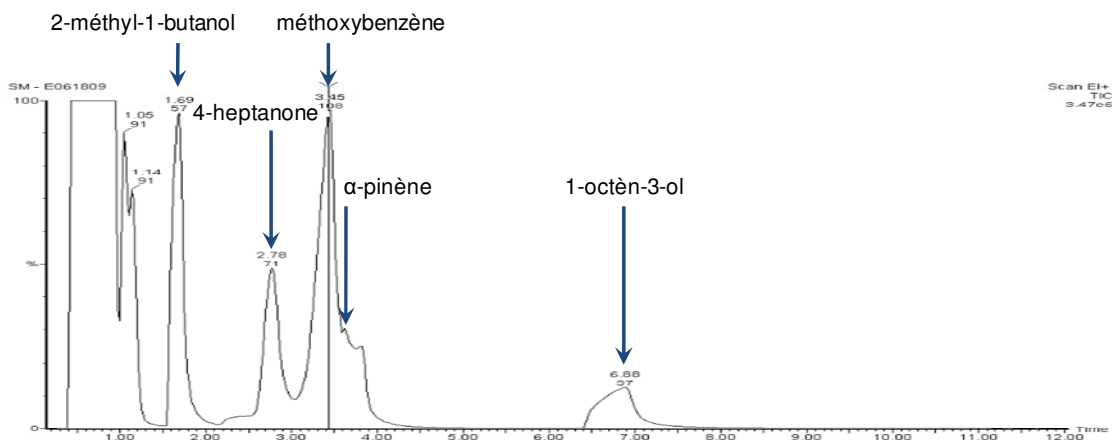


Figure III-34: Chromatogramme d'un tube contenant les 8 traceurs (Chaîne Perkin-Elmer)

Suite à ces essais sur des traceurs, des essais avec des environnements contaminés et non contaminés (témoin) ont été menés. Pour ces essais, 4 chambres témoins ainsi que 4 chambres contaminées par *Aspergillus niger* sur de la toile de verre ont été réalisées. Des prélèvements ont été faits sur tubes Tenax à 100 mL.min<sup>-1</sup> pendant 30 min. Sur les 4 chambres témoins, seul l'alpha-pinène (traceur provenant de sources multiples) a été retrouvé (t<sub>r</sub> : 3,21 min) (Figure III-35 et Figure III-36).

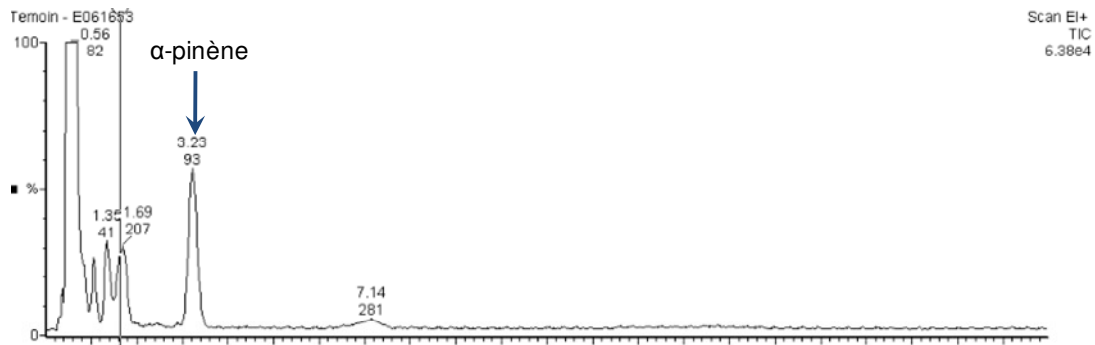


Figure III-35: Chromatogramme de l'air prélevé dans une chambre témoin (Perkin-Elmer)

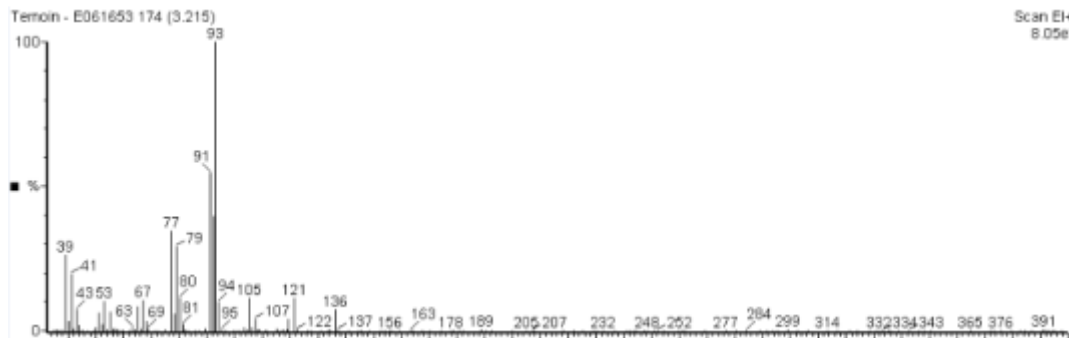


Figure III-36: Spectre de masse de l'alpha-pinène

Après avoir analysé l'air des chambres témoins, l'air des chambres contaminées a été prélevé puis analysé (Figure III-37). Sur les chambres contaminées, le 3-heptanol (tr : 3,64 min) et le 2-éthylhexanol (t<sub>r</sub> : 10,70 min) ont pu être identifiés (Figure III-38 et Figure III-39).

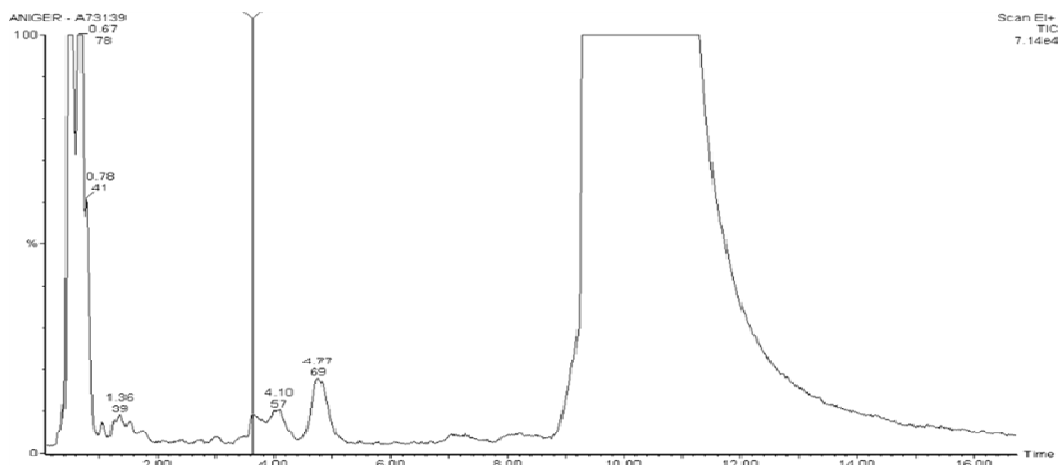


Figure III-37: Chromatogramme de l'air prélevé dans une chambre contaminée par *Aspergillus niger* (Perkin-Elmer)

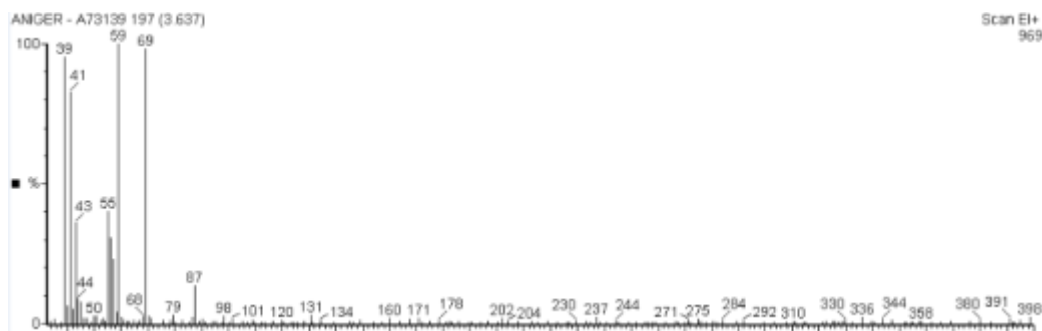


Figure III-38: Spectre de masse du 3-heptanol

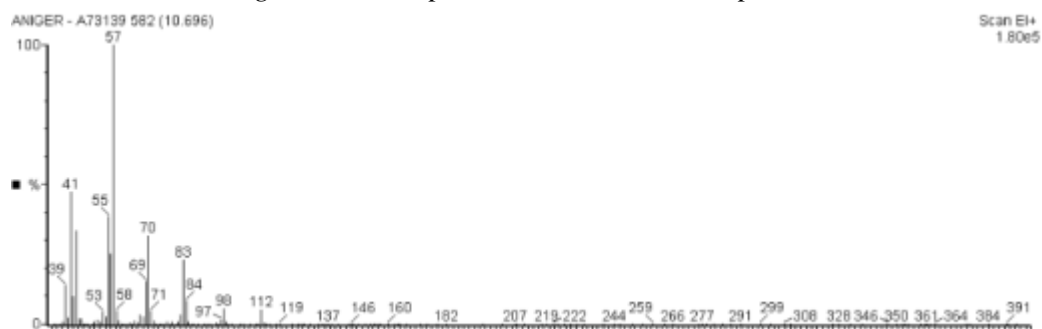


Figure III-39: Spectre de masse du 2-éthylhexanol

Concernant la microcolonne n°2, 6 traceurs présents dans la solution ont pu être séparés avec des temps de rétention différents allant de 0,50 à 4,64 min (Figure III-40).

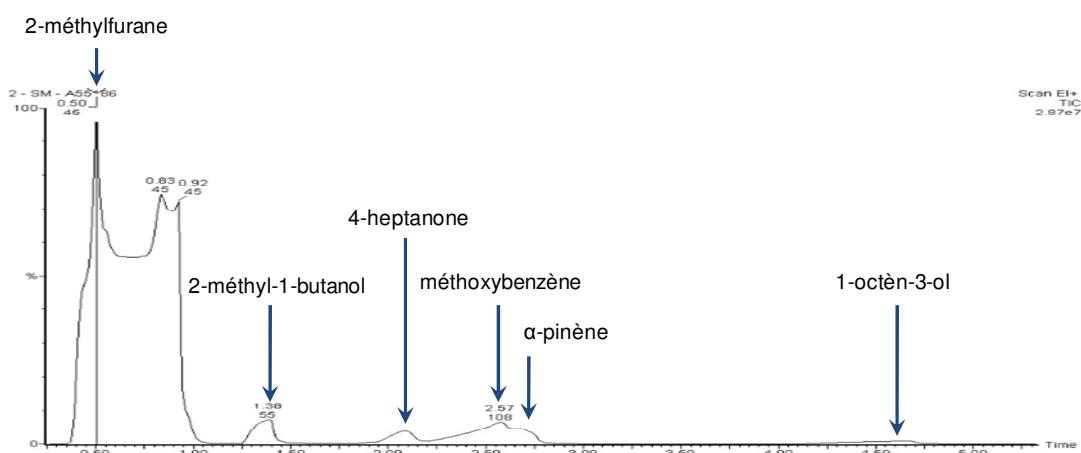


Figure III-40: Chromatogramme des émissions de la chambre contenant les 8 traceurs (Perkin-Elmer)

Avec ce cycle de température (Tableau III-2), les 6 produits identifiés sont le 2-méthylfurane ( $t_r$  : 0,50 min), le 2-méthyl-1-butanol ( $t_r$  : 1,36 min), le 4-heptanone ( $t_r$  : 2,06 min), le méthoxybenzène ( $t_r$  : 2,55 min), l'alpha-pinène ( $t_r$  : 2,66 min) et le 1-octèn-3-ol ( $t_r$  : 4,64 min). Afin de vérifier les temps de rétention de chaque composé, des essais ont été réalisés 10 fois. Des temps de rétention identiques à ceux obtenus lors des essais précédents ont été retrouvés. Le pic qui s'étend de 0,20 à 0,92 min correspond au 2-méthylfurane masqué par le solvant. En réalisant une analyse plus fine des chromatogrammes, un pic plus net et dépourvu de l'interférence du solvant a été obtenu. Cela a permis d'obtenir un temps de rétention plus précis pour le 2-méthylfurane (Figure III-41).

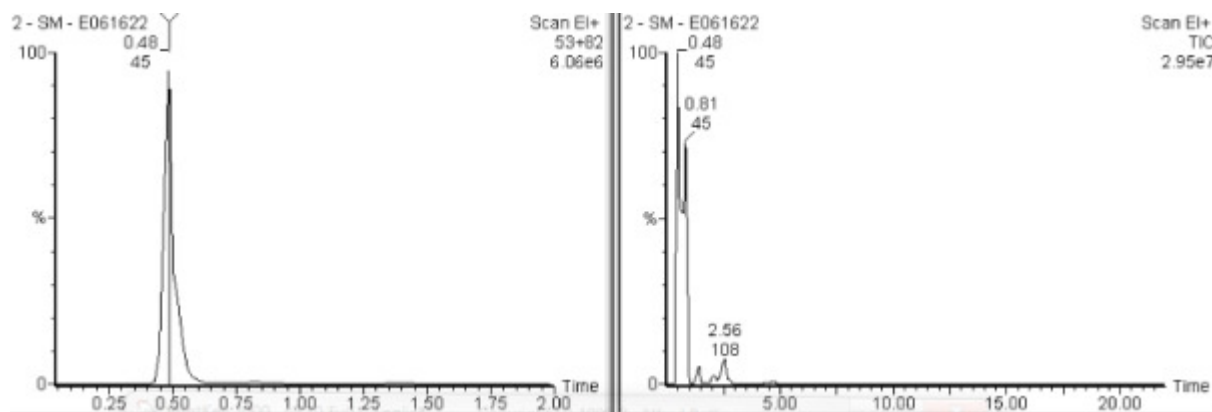


Figure III-41: Analyse du pic s'étendant de 0,2 à 0,92 min (Perkin-Elmer)

La microcolonne n°2 a été branchée dans un second temps sur la chaîne analytique HP, le débit a ainsi été modifié à  $0,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  et une isotherme à  $40^\circ\text{C}$  a été réalisée.

Le chromatogramme obtenu à partir des 8 traceurs en solution est présenté Figure III-42.

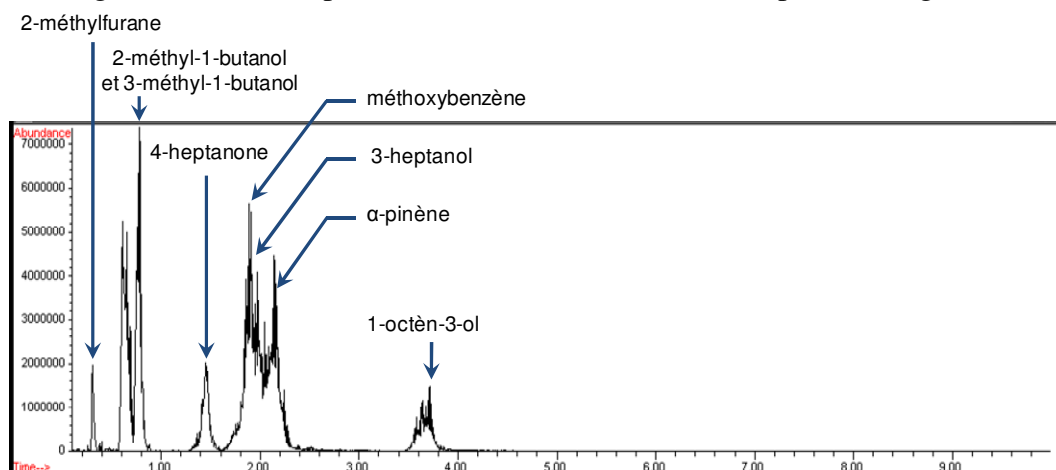


Figure III-42 : Chromatogramme obtenu à partir de l'injection de  $5 \mu\text{L}$  de la solution mère contenant 8 traceurs dans de l'éthanol (HP)

La microcolonne testée a permis la séparation de 7 traceurs parmi les 8 testés: le 3-méthyl-1-butanol et le 2-méthyl-1-butanol, qui sont des isomères, sont coélués.

Suite à ces essais sur des traceurs, des essais avec des environnements contaminés et non contaminés (témoin) ont été menés. Les chambres témoins et les chambres contaminées utilisées pour les essais sur la microcolonne n°1 ont été conservées pendant 1 semaine après le premier prélèvement. Ainsi, les chambres ont pu réémettre des COV.

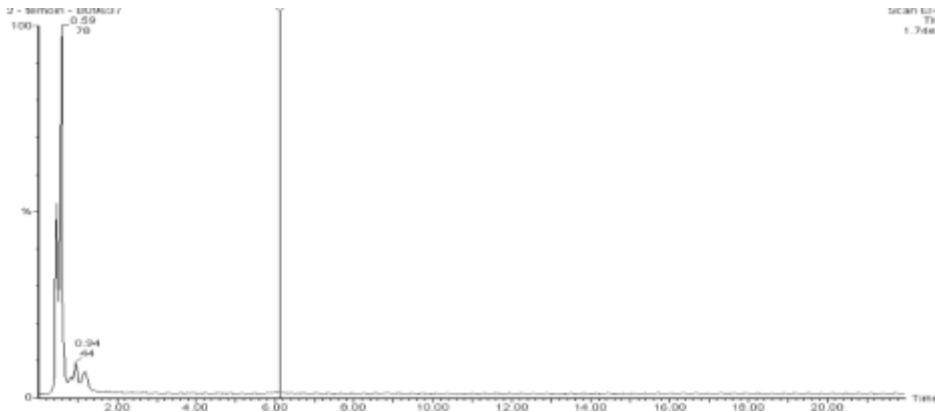


Figure III-43: Chromatogramme de l'air prélevé dans une chambre témoin (Perkin-Elmer)

Sur les 4 chambres témoins, seul le 2-méthyl-1-butanol ( $t_r$ : 1,36 min) (traceur multisource) a été retrouvé (Figure III-43)

Après avoir analysé l'air des chambres témoins, l'air des chambres contaminées a été prélevé puis analysé (Figure III-44).

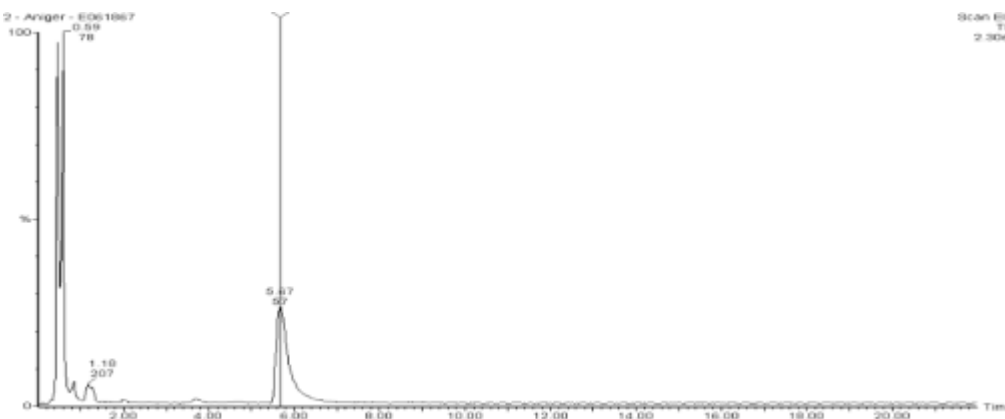


Figure III-44: Chromatogramme de l'air prélevé dans une chambre contaminée par *Aspergillus niger* (Perkin-Elmer)

Sept des 8 traceurs testés précédemment n'ont pas été retrouvés dans les chambres contaminées. Ceci peut-être expliqué par le fait que les émissions issues de ces chambres soient faibles, donc pas assez concentrées par rapport à la solution avec les 8 traceurs. Seul le 2-éthylhexanol, qui est un COV émis par la moisissure, a été observé ( $t_r$ : 5,67 min) (Figure III-45).

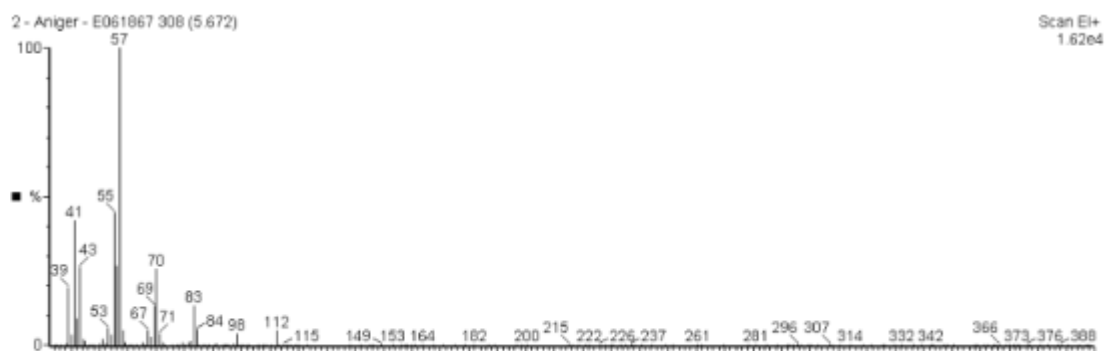


Figure III-45: Spectre de masse du 2-éthylhexanol

Moularat (2005) avait quantifié les émissions dans une chambre contaminée par *Aspergillus niger* sur toile de verre selon le même protocole utilisé dans notre expérimentation (Tableau III-8). Des essais ont donc été menés avec des solutions filles issues de dilution de la solution mère à  $5 \text{ g.L}^{-1}$ , leurs concentrations allant de 1 à  $30 \mu\text{g. m}^{-3}$ . La microcolonne n'a pu détecter les composés qu'à partir d'une concentration de  $15 \mu\text{g. m}^{-3}$ . Cela pourrait expliquer le fait que la microcolonne ait détecté le 2-éthylhexanol (concentration de  $1153,35 \mu\text{g. m}^{-3}$ ) mais pas les traceurs issus de la chambre contaminée.

Tableau III-8 : Concentration des COV émis lors du développement d'*Aspergillus niger* sur la toile de verre.

Composés	Concentrations des COV ( $\mu\text{g. m}^{-3}$ ) émis lors du développement d' <i>Aspergillus niger</i> sur toile de verre
1-octèn-3-ol	6,06
2-méthylfurane	0,95
2-méthyl-1-butanol	<LQ
3-méthyl-1-butanol	<LQ
3-heptanol	7,34
4-heptanone	33,6
méthoxybenzène	<LD
alpha-pinène	21,32
<b>2-éthylhexanol</b>	<b>1153,35</b>

<LD : inférieur à la limite de détection

<LQ : composé détecté mais inférieur à la limite de quantification

En raison de ces faibles émissions, une analyse en mode SIM a été réalisée et a permis de retrouver les 8 traceurs (Figure III-46).

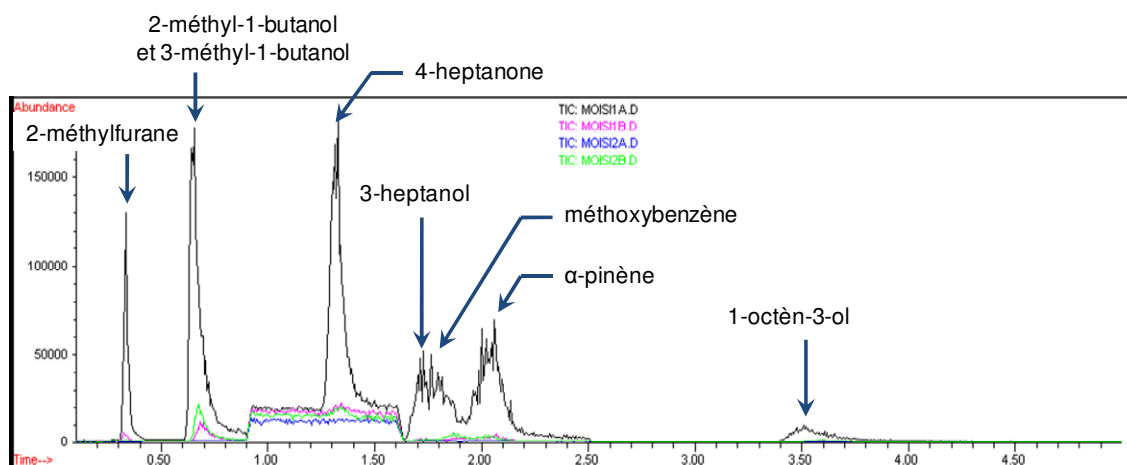


Figure III-46 : Superposition de 4 chromatogrammes obtenus à partir d'air prélevé dans des chambres contenant de la toile de verre contaminée par *Aspergillus niger*.

Une analyse fine des chromatogrammes obtenus à partir des chambres contaminées par les moisissures, a permis d'identifier d'autres traceurs spécifiques d'une contamination : 2-heptène, méthyl-2-éthylhexanoate et 1,3-octadiène. L'ensemble de ces composés sont également séparés. La répétabilité de ces résultats a été vérifiée pour cette microcolonne.

Ces divers essais ont permis de voir que les microcolonnes étaient en mesure de séparer de 5 à 11 traceurs (suivant les microcolonnes). Les différences observées entre les 2 microcolonnes au niveau de la rétention sont dues à une différence dans le dépôt de la phase stationnaire. En effet, le débit d'évaporation n'ayant pas été maintenu constant au cours du 1<sup>er</sup> dépôt, il en a résulté une irrégularité de la phase stationnaire. Les essais sur la 1<sup>ère</sup> microcolonne ont permis d'améliorer le dépôt de la phase stationnaire pour la 2<sup>ème</sup> microcolonne en adoptant un débit optimal d'évaporation. L'ensemble de ces essais a également permis de trouver les conditions les plus adaptées pour la séparation des traceurs (isotherme à 40°C et débit d'hélium à 0,5 mL.min<sup>-1</sup>) et de réduire considérablement le temps d'analyse (10 min environ pour les microcolonnes contre 1 h 30 s pour une colonne standard). Ainsi, ces essais ont permis de valider le module de séparation en montrant l'obtention de temps de rétention différents pour 11 des traceurs permettant le calcul de l'indice de contamination fongique.

### II.5.C Caractérisation du module de détection

Des essais ont été réalisés à partir des couches sensibles définies précédemment afin de les implémenter dans le module de détection du système composé des paires d'électrodes et de la chambre de confinement associée.

Les essais préliminaires avec le système multicapteurs ont permis de mettre en évidence la possibilité de distinguer deux types d'environnements (stérile et contaminé) à partir de capteurs polymères dans des ambiances contrôlées. Le principe du module de détection utilisé dans ce système s'appuie donc sur ces résultats afin de permettre la détection des COV fongiques en sortie des modules d'échantillonnages.

Lors de ces essais, des limites liées à l'utilisation de polymères conducteurs, telles que l'interférence de l'humidité, ou encore la sélectivité et la sensibilité relativement faibles des couches sensibles vis-à-vis des faibles concentrations de COV fongiques rencontrées dans un environnement intérieur, ont été observées. L'utilisation des modules de prétraitement permet de remédier à ces limites.

Ainsi, le système permet d'exposer, de manière successive, les couches sensibles à chacun des composés sélectionnés en sortie des modules de prétraitement. Ce module de détection doit donc permettre de détecter et d'identifier, par couplage avec les modules précédents, les composés recherchés.

Suite à la conception des électrodes à partir d'un wafer en verre, la première phase consiste à réaliser le dépôt des couches sensibles sur les électrodes interdigitées. Comme avec la carte du système multicapteurs, deux types de dépôt sont envisageables selon la solubilité du polymère, par dépôt d'une goutte et par électropolymérisation.

Les premiers essais sur le module de détection ont été réalisés à partir du polymère conducteur PEDOT-PSS précédemment étudié. Ce polymère commercial étant en solution, son dépôt (à la micropipette), relativement simple à mettre en œuvre, permet de multiplier les essais. Concernant la conception des électrodes interdigitées, deux géométries ont été envisagées avec 6 et 26 bandes interdigitées. Divers dépôts de PEDOT-PSS ont ainsi été réalisés, permettant d'obtenir différentes valeurs de résistance nominale pour chacun d'eux.

Pour 9 dépôts réalisés sur une électrode à 6 bandes, une dispersion de résistance nominale de 74 % est calculée. Cette variation peut être due à la fois à la quantité de polymère déposé (variations dues à la précision du dépôt), mais aussi au nombre de paires de bandes recouvertes. Ainsi, pour un même nombre de paires de bandes recouvertes, la dispersion est inférieure à 15 % (une résistance nominale plus faible est obtenue en augmentant le taux de recouvrement des bandes interdigitées).

La valeur de résistance nominale moyenne obtenue avec le dépôt d'une goutte de polymère sur l'ensemble des bandes est de 1 k $\Omega$  avec 26 bandes contre 14 k $\Omega$  avec 6 bandes.

Afin de caractériser la réponse de ces capteurs vis-à-vis des COV fongiques, des essais ont été réalisés avec les 8 traceurs utilisés pour la caractérisation des modules de prétraitement. Pour cela, une pompe permet de transférer, à 6 mL.min<sup>-1</sup>, l'air provenant de chambres d'émissions, contenant chacune des traceurs, vers la chambre de confinement contenant les capteurs.

La carte de traitement des signaux des capteurs doit permettre l'acquisition d'une image des variations de résistivité, qu'engendre la présence du COV, via la mesure de la tension dans le pont de Wheatstone associé à chacun des capteurs. Les essais ont montrés que ce type de mesure n'est pas réalisable avec les capteurs testés. En effet, une polarisation différentielle du pont avec une tension inférieure à 4 V (alimentation +2 V/-2 V) ne permet pas une amplification suffisante nécessaire à l'observation de variations de résistivité engendrées par les traceurs. Une polarisation supérieure à 4 V engendre une détérioration du polymère le rendant non conducteur du fait de l'application d'un potentiel supérieur au potentiel d'oxydation du polymère.

Afin d'observer des variations engendrées par l'adsorption de traceurs, une mesure en continu de la résistance des capteurs a été réalisée avec un Ohmmètre. Contrairement à la carte de traitement décrite ci-dessus, cette mesure n'implique pas l'application d'un fort potentiel. Pour chaque traceur, l'évolution de la résistance du capteur, engendrée par un flux d'air appliqué durant 5 s, est représentée Figure III-47.

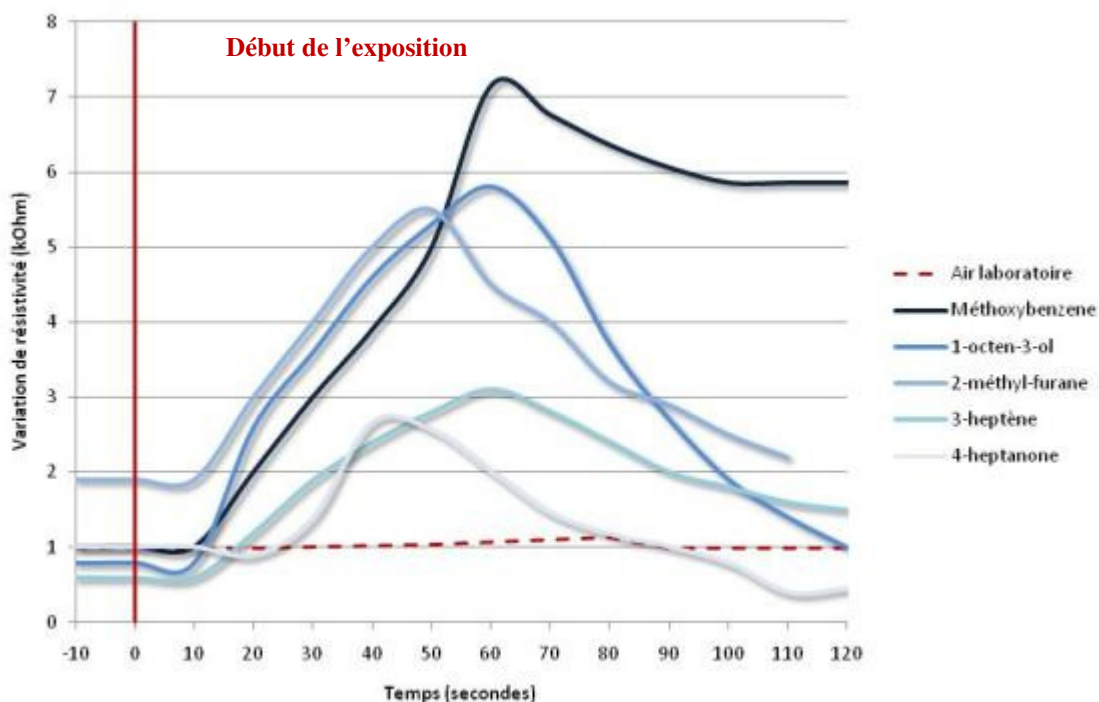


Figure III-47 : Evolution de la résistivité du capteur pour une exposition d'une durée de 5 secondes aux différents traceurs

Sur les 8 traceurs testés, 5 (2-méthylfurane, 1-octèn-3-ol, méthoxybenzène, 3-heptène, 4-heptanone) ont été détectés avec ce polymère conducteur. Lors de ces essais, un temps de réponse relativement long a été observé avec une augmentation de la résistance durant plus de



30 s et un retour à l'équilibre supérieur à 60 s. Afin de caractériser au mieux la forme du signal de retour à la ligne de base, la durée d'exposition au COV a été réduite à une seconde au lieu de 5 précédemment. Le temps de retour à la ligne de base passe de 60 à 20 s.

Différents phénomènes expliquent cette faible vitesse de réaction du capteur. Le faible débit ( $6 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ) entraîne un temps de transition important des molécules et des phénomènes de dilution entre la chambre d'émission et le module de détection augmentent le temps de contact des composés avec le polymère. De plus, les valeurs des résistances nominales (supérieur à  $1 \text{ k}\Omega$ ) des différents dépôts de PEDOT-PSS réalisés sont importantes comparées à la variation de résistance induite par l'adsorption d'un COV. Ainsi, une valeur de résistance nominale élevée implique que le polymère est peu conducteur. Or, plus la résistance nominale est faible et plus le temps de réponse est court par le fait de phénomènes de transport électriques plus rapides.

Un phénomène de dédopage peut également expliquer la faible réactivité du capteur. En effet, une lente augmentation de la résistance est observée lors de l'exposition à des COV. Le dédopage du PEDOT-PSS est généralement décrit comme impliquant le départ de l'anion  $\text{PSS}^-$  lors de la réduction du  $\text{PEDOT}^+$  en PEDOT. Le processus de dédopage est relativement lent du fait de la grande taille de l'anion  $\text{PSS}^-$ . Lors de l'adsorption du COV, une réaction redox (échange d'électrons) se produit entre le COV et le polymère. Ainsi, le COV prend la place du contre-ion et donne ses électrons au polymère. Ce phénomène peut également engendrer un gonflement du polymère impliquant un écartement des chaînes. Les sauts d'électrons sont alors défavorisés et une augmentation de la résistivité est observée. Par ailleurs, l'étude de ce phénomène montre qu'à partir d'échantillons de polymères ayant une résistance initiale plus faible, le dédopage apparaît plus rapide.

Ainsi les tailles des dépôts et des électrodes de contact doivent-être modifiées afin de diminuer la valeur de la résistance nominale et ainsi faciliter les interactions entre le polymère et le COV. Les essais ont permis de mettre en évidence qu'un nombre plus important de bandes interdigitées permet d'obtenir des valeurs de résistance plus faible.

### III DISCUSSION SUR LES MICROMODULES DU SYSTEME D'ANALYSE

Un procédé de fabrication basé sur les technologies MEMS a été défini, afin de réaliser deux microstructures inspirées des chaînes d'analyses classiques de chromatographie en phase gazeuse. Des procédés de fonctionnalisation ont également été définis pour chacune des deux structures. La microstructure de concentration est ainsi fonctionnalisée avec des grains de Tenax TA, cet adsorbant ayant été employé lors de la phase de développement des indices de contamination fongique, il est par définition le plus adapté à la sélectivité des composés ciblés. Par conséquent, le choix du Tenax TA apparaît pertinent pour la fonctionnalisation de la microstructure de concentration.

De plus, l'hydrophobicité du Tenax permet de réduire la rétention des molécules d'eau lors du prélèvement. Cette propriété présente un avantage dans le cas d'un couplage avec un module de détection composé de capteurs chimiques dont la sensibilité à l'humidité est un inconvénient.

Les tubes Tenax de prélèvement classiquement utilisés pour la détection des COV dans cette étude contiennent un volume utile de  $1 \text{ cm}^3$  avec des grains de diamètre moyen de  $300 \mu\text{m}$ . La taille des grains utilisée pour la microstructure (diamètre moyen de  $120 \mu\text{m}$ ) permet d'augmenter la surface spécifique. Par conséquent, malgré la diminution du volume utile ( $0,20 \text{ cm}^3$ ), la surface active équivalente est conservée. Ainsi, l'efficacité de concentration (rétention et volume de perçage) de cette microstructure reste équivalente à un tube de

prélèvement classique. Les essais réalisés lors de la caractérisation des micromodules confirment cette hypothèse.

Les chaînes d'analyses classiques disposent d'un piège à froid en aval du tube d'adsorption permettant l'envoi simultané de l'ensemble des composés dans la chaîne analytique. Dans le cas du préconcentrateur développé dans cette étude, le choix d'un matériau de fabrication conducteur de chaleur (silicium) et de faible épaisseur (500  $\mu\text{m}$ ) permet d'obtenir des changements de températures rapides (plus de 80°C en 30 s). Les traceurs étudiés dans cette étude étant désorbés à basse température (de 40°C à 50°C), l'utilisation d'un piège à froid ne s'avère pas nécessaire. De plus, la forme géométrique des canaux de la microstructure (sillons droit) facilite le passage du flux d'air, améliorant encore la libération des molécules.

Des structures plus complexes dans leur conception ont été réalisées lors d'autres études traitant des microstructures de préconcentration (Agah *et al.*, 2006; Lewis *et al.*, 2006; Zellers *et al.*, 2007). Elles permettent une optimisation du volume en évitant des passages d'air préférentiels, aussi, des voies d'optimisation sont envisageables. Ces études montrent l'intérêt de développer ces microstructures de préconcentration pour augmenter l'efficacité des microsystèmes d'analyse des gaz basés sur la chromatographie.

Dans le cas d'un mélange gazeux complexe, ces microstructures de concentration doivent être associées à une technique de séparation (chromatographie) pour permettre son analyse. Les traceurs fongiques sélectionnés étant des composés polaires, le choix d'une phase stationnaire relativement polaire (par rapport aux autres phases tel que les Carbowax) permet également de faciliter leurs rétentions dans la colonne. La longueur de la microcolonne (5 m) étant plus courte que celle d'une colonne classique (50 m), l'efficacité de rétention des composés cibles doit être optimale. Des films épais de polydiméthylsiloxanes permettent l'analyse de composés légers, tels que les traceurs sélectionnés. Ainsi, le PDMS (Sylgard® 184, Dow Corning), constitué jusqu'à 70 % de diméthylsiloxane, a été sélectionné comme phase stationnaire pour la fonctionnalisation des colonnes. Les groupements vinyles contenus dans cette phase (en complément du diméthylsiloxane) favorisent la réticulation et la stabilité du polymère, améliorant ainsi la séparation. Les tests de séparation réalisés dans cette étude confirment que cette phase permet d'obtenir une séparation suffisante pour notre problématique, malgré la faible longueur de la colonne.

Il reste difficile de comparer ces résultats avec la littérature puisqu'aucune de ces études ne travaille sur les traceurs d'un développement fongique. Malgré tout, d'autres composés plus classiquement recherchés, tels que le benzène et le toluène, sont également présents dans des échantillons contaminés par des moisissures. Il a été ainsi possible de comparer les efficacités de rétention pour ces deux molécules avec d'autres études développant des microcolonnes PDMS. Ainsi, Serrano *et al.*, en 2009, à partir d'une microcolonne de 3 m, obtiennent une différence de rétention de 10 s (Serrano *et al.*, 2009). Reidy *et al.* en 2006, avec des colonnes de 0,5 à 3 m, obtiennent des temps compris entre 15 et 40 s selon la longueur de la colonne (Reidy *et al.*, 2006). Les variations de rétention obtenues dans nos essais sont du même ordre de grandeur puisque que ces deux composés sont désorbés, dans nos conditions d'essai, à 24 s d'intervalle.

Les essais de caractérisation des deux microstructures, à partir de chaînes analytiques classiques de chromatographie en phase gazeuse, ont permis de mettre en évidence l'efficacité des modules pour la rétention et la séparation des composés d'échantillon gazeux contrôlés. En effet, la rétention et la séparation des huit traceurs fongiques testés en laboratoire ont été validées. De plus, lors des tests sur des chambres contaminées, la séparation de trois autres traceurs spécifiques de contaminations fongiques a pu être observée.

Concernant le module de détection, des essais préliminaires de caractérisation de couches sensibles à partir d'un système multicapteurs composés de polymères conducteurs ont permis d'identifier des polymères permettant la distinction entre un environnement stérile et un environnement contaminé par un développement fongique. Ces polymères conducteurs ont ainsi été implémentés dans le module de détection en sortie du système avec le développement de paires d'électrodes et d'une chambre de confinement.

Le choix d'un système multi-capteurs basé sur les polymères conducteurs a été guidé tout d'abord, par les propriétés cinétiques de ces derniers à température ambiante, par la grande variété de monomères et les multiples possibilités de substitutions permettant une grande diversification des capteurs. Contrairement à d'autres familles de capteurs chimiques, comme les oxydes métalliques, les polymères conducteurs permettent la détection de molécules polaires telles que les traceurs utilisés dans les indices de contamination fongique (Albert *et al.*, 2000).

Les polymères conducteurs permettent de passer outre les limites (modularité, spécificité aux composés polaires, consommation énergétique...) des oxydes métalliques ou des matériaux composites. Leurs compositions chimiques sont semblables à celles des COV, ce qui induit des interactions physiques entre le polymère et le COV. Par ailleurs, leurs structures sont modifiables, ce qui permet de créer des matériaux avec des sélectivités définies afin de cibler les COV.

En effet, une large gamme de polymères est réalisable par polymérisation chimique ou électrochimique. Ainsi, la sélectivité et la sensibilité de ces couches peuvent être modifiées en variant la morphologie des films de polymère via les conditions de polymérisation et de dopage. De plus, l'état d'oxydation du polymère peut également être modifié après dépôt afin d'optimiser les transferts de charge entre le polymère et le composé cible. Par ailleurs, la mise-en-œuvre de ces capteurs par dépôt électrochimique ou en solution permet leurs intégrations sur différents supports.

L'ensemble de ces caractéristiques rend pertinente l'utilisation de cette famille de capteurs vis-à-vis de la problématique de cette étude (traceurs polaires, facilité d'intégration, modularité...). Cependant, les mécanismes précis d'interactions restent méconnus et le paramètre de l'humidité est un facteur à prendre en considération au cours des études s'appuyant sur cette technologie pour la détection de COV dans des environnements réels.

## **CHAPITRE IV : ELABORATION DU MICROSYSTEME D'ANALYSE**

Ce système s'appuie sur le développement de 3 modules principaux retrouvés dans les chaînes d'analyse classiques des COV, à savoir, un module de préconcentration, un module de séparation et un module de détection à base de capteurs chimiques. Ces modules s'appuient sur des microstructures décrites dans la littérature et adaptées à notre problématique. Le principe du système repose également sur une sélection des particules d'intérêts permettant d'augmenter sa sélectivité et sa longévité.

La dernière phase de cette partie de l'étude concerne l'assemblage des différents éléments composant le système. Cette phase comprend le couplage entre les modules, la commande des éléments constituant le système et le développement de l'interface avec l'utilisateur pour permettre de réaliser les différentes phases nécessaires à l'analyse des composés cibles. Après avoir proposé un système de détection, la définition et la conception de ce système permettra la caractérisation de la réponse des capteurs à des solutions étalons, puis à des ambiances moisies.

### **I INTERFACE DE COMMANDE DU SYSTEME D'ANALYSE**

#### **I.1 ARCHITECTURE DU SYSTEME D'ANALYSE**

##### **I.1.A Principe du système d'analyse**

Le système d'analyse développé dans cette étude se compose de trois modules principaux que sont le module de préconcentration, le module de séparation et le module de détection. Ces modules constituant les éléments principaux utilisés dans une analyse par chromatographie, le système doit permettre une gestion de la circulation de l'air (prélèvement, gaz vecteur) et de la température des structures microfluidiques pour réaliser les différentes étapes de l'analyse. Les modules développés dans cette étude se composent de connecteurs fluidiques adaptés aux microstructures, permettant d'équiper les orifices d'accès de capillaires (tubes PEEK) et ainsi de pouvoir réaliser des connexions entre les modules ou à des micro-éléments tels que des pompes et des vannes. Un schéma de principe utilisant des pompes et des électrovannes a donc été imaginé autour des trois modules composant le système.

Le schéma de principe du système est présenté en Figure IV-1 et se compose donc des trois modules, d'une pompe et de 3 électrovannes.

Durant la phase de concentration, la pompe permet le prélèvement de l'échantillon par une circulation d'air à travers le module. Ainsi, par procédé d'accumulation des molécules, la concentration des molécules contenues dans l'échantillon d'air à analyser sont retenues dans la microstructure. Durant la phase d'analyse, en entrée du système, un filtre (charbon actif) permet par association avec la pompe, une circulation d'air propre à travers le système servant ainsi de gaz vecteur.

Les électrovannes permettent de choisir la direction des flux d'air durant les étapes de l'analyse. Des éléments chauffants associés à un régulateur de température sont également intégrés au système afin de permettre la chauffe des microstructures de concentration et de séparation pour permettre la libération des molécules piégées.

Le système est piloté à l'aide d'une carte de commande permettant, d'une part de gérer les commandes des électrovannes, des régulateurs de température et de la pompe, d'autre part, de récupérer les informations transmises par les capteurs.

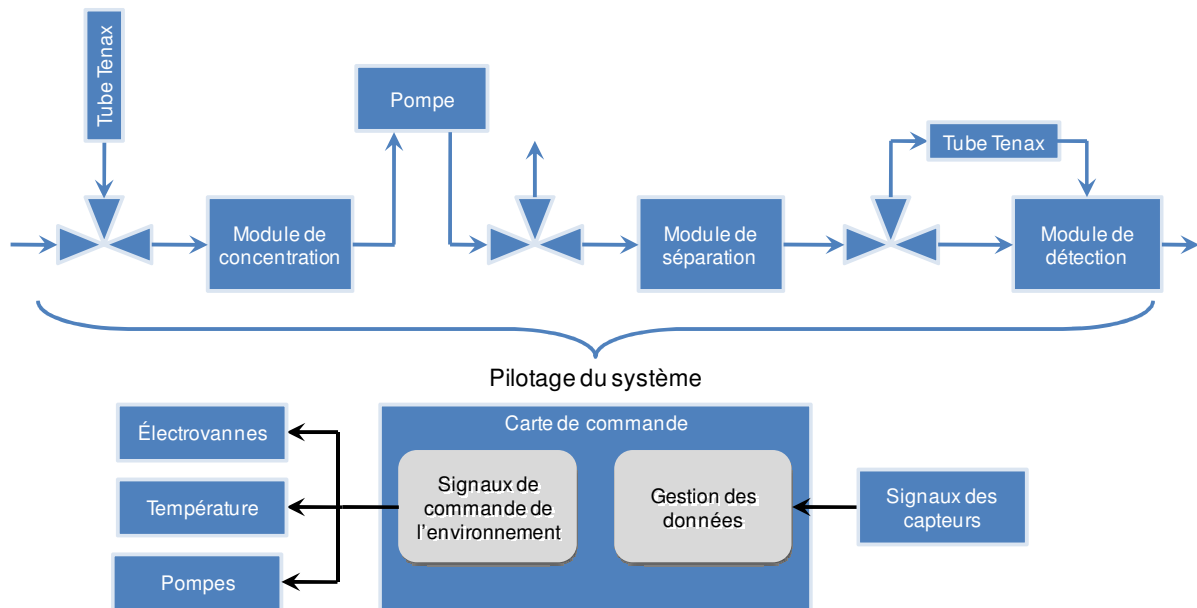


Figure IV-1 : Schéma de principe du système d'analyse

### I.1.B Description des étapes d'analyse

L'analyse d'un échantillon se décompose donc en deux étapes principales identiques à un système de chromatographie gazeuse classique, à savoir la concentration de l'échantillon puis l'analyse par séparation. L'utilisation des pompes et des électrovannes permet de diriger le flux d'air à travers les modules par des basculements de leurs états. Le schéma présenté en Figure IV-2 associe les états possibles des différents éléments composant le système en fonction de l'étape d'analyse effectuée. Quatre situations représentatives de l'étape de l'analyse peuvent ainsi être définies : « inactif », « concentration », « analyse molécule » et « nettoyage capteurs ».

Un état « inactif » du système correspond à l'état du système au début et à la fin des étapes d'analyses.

Un état « concentration » correspond à la première étape consistant à prélever l'air à analyser à travers la microstructure de concentration permettant ainsi la concentration de l'échantillon.

Les états « analyse molécule » et « nettoyage capteurs » correspondent aux deux états pris par le système en fonction de la présence ou de l'absence d'une molécule d'intérêt.

Le système permet la séparation des molécules de l'échantillon avec un temps de rétention propre aux différentes molécules. En sortie du module de séparation, lorsque le temps d'analyse correspond au temps de rétention d'une des molécules d'intérêt, le système bascule dans l'état « analyse molécule » pendant quelques secondes afin de diriger les molécules vers le module de détection. En dehors du temps de passage d'une molécule à analyser, le système est maintenu à l'état « nettoyage capteurs » permettant ainsi une circulation d'air propre (filtré par charbon actif) dans le module de détection.

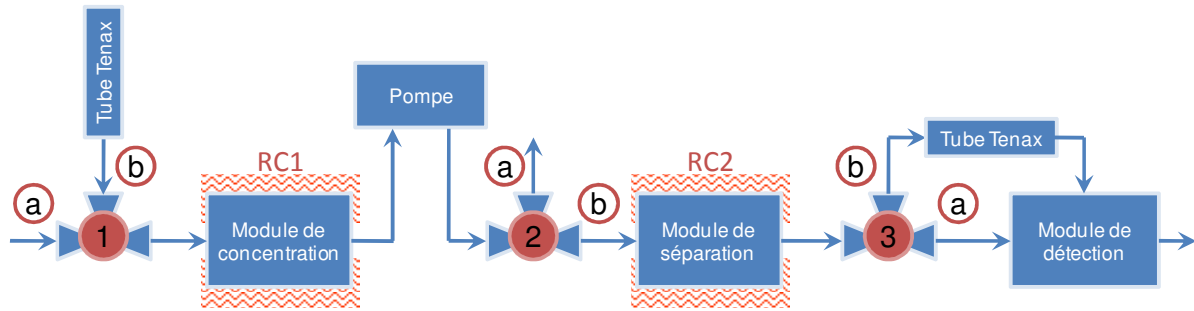


Figure IV-2 : Représentation schématique des états des éléments du système d'analyse

Le Tableau IV-1 définit les états des différents éléments du système en fonction de l'étape d'analyse effectuée. L'état des pompes (P1 et P2) est représenté par un état « On » et un état « Off » lorsqu'elles sont respectivement en état de marche ou éteinte. Les résistances chauffantes, nommées RC1 pour le module de concentration et RC2 pour le module de séparation, sont également représentées par un état « On » et un état « Off » lorsqu'elles sont respectivement alimentées ou non. Enfin, les électrovannes (numérotée de 1 à 4 sur la Figure IV-2) sont représentées par un état « a » ou un état « b » en fonction de la direction du flux d'air choisie.

Tableau IV-1 : Etats des éléments du système en fonction de l'étape d'analyse

Etat du système	Vanne			Pompe	Résistances chauffantes	
	n°1	n°2	n°3		RC1	RC2
Inactif	b	b	b	Off	Off	Off
Concentration	a	a	b	On	Off	Off
Nettoyage capteurs	b	b	b	On	On	On
Analyse molécule	b	b	a	On	On	On

### I.1.C Description des éléments constitutifs du prototype

Le système utilise des micro-éléments tels que les pompes, les résistances chauffantes et les électrovannes. Souhaitant obtenir un système le plus compact possible, ces éléments ont été sélectionnés avec un encombrement minimal en fonction de leurs performances pour répondre aux contraintes imposées par le système. Ces éléments sont disponibles commercialement chez divers spécialistes.

La pompe sélectionnée est une pompe excentrique à membrane, commercialisée par Scharzer Precision, dont les caractéristiques sont présentées en Figure IV-3.



Référence	Caractéristiques physique	
	Dimensions [mm]	Poids [g]
SP 725 EC	106x43x74	570

Caractéristiques moteur		
Tension nominale [Vdc]	Type de moteur	Consommation max. [mA]
24	Moteur DC	750

Puissance pneumatique				
Flux libre [l/min]	à 300 mbar [l/min]	à -300 mbar [l/min]	Pression max. [mbar]	Vide max. [mbar]
8.0	6.5	2.5	2800	-680

Figure IV-3 : Caractéristiques des pompes du système

La pompe fonctionne sous alimentation continue entre 0 et 24 V. Les caractéristiques de la pompe ont été choisies en fonction de la perte de charge engendrée par l'utilisation de microcanaux comprise entre 1 et 2 bars.

Concernant les éléments chauffants utilisés pour les modules de concentration et de séparation, le choix s'est porté sur des réchauffeurs en mica fabriqués par la société MINCO. Ces éléments se composent d'un élément laminaire gravé pris entre deux couches de mica pour une épaisseur de 0,5 mm. Ces films peuvent atteindre rapidement des températures importantes (jusqu'à 600°C) avec une température homogène sur la surface du film. Les microstructures à chauffer sont alors mises en contact avec le réchauffeur entre deux couches d'isolant (papier céramique de 3,2 mm d'épaisseur) et maintenue mécaniquement entre deux plaques d'aluminium (Figure IV-4).

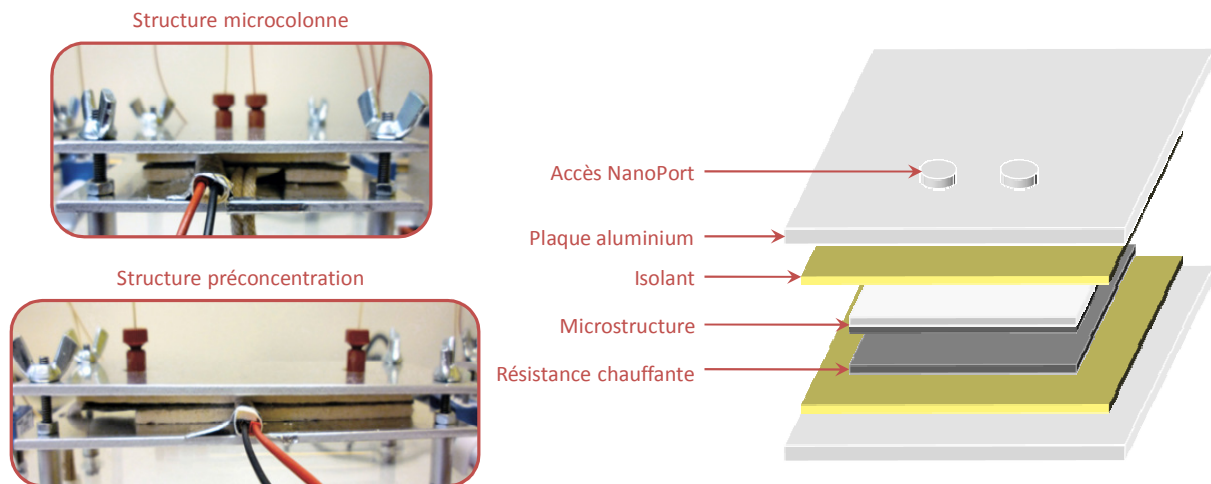


Figure IV-4 : Photographie du montage avec les éléments chauffants

Les caractéristiques des éléments utilisés pour chacune des deux microstructures sont reportées dans le Tableau IV-2.

Tableau IV-2 : Caractéristiques des réchauffeurs mica

Réchauffeur concentrateur			
Dimensions (mm)	épaisseur (mm)	Résistance (Ohm)	surface effective (cm <sup>2</sup> )
25.4 x 101.6	0.5	21.2	16.13
Réchauffeur colonne			
Dimensions (mm)	épaisseur (mm)	Résistance (Ohm)	surface effective (cm <sup>2</sup> )
50.8 x 50.8	0.5	23.2	18.06

Un système de régulation en température permet de contrôler la température appliquée sur les microstructures. Le contrôleur de température miniature de CT325 est conçu pour être utilisé avec les réchauffeurs et utilise une sonde de température (sonde PT100). Ce régulateur fonctionne en "Marche/Arrêt" en fonction de la température de consigne et de la température renvoyée par la sonde. L'ajustement du point de consigne de température se fait à l'aide d'un simple potentiomètre et d'un voltmètre. Il fonctionne à partir d'une alimentation continue (de 4,75 à 60 V) et permet d'utiliser un courant d'alimentation du réchauffeur jusqu'à 4 A. Une photographie du régulateur ainsi que son diagramme de fonctionnement sont représentés en Figure IV-5.

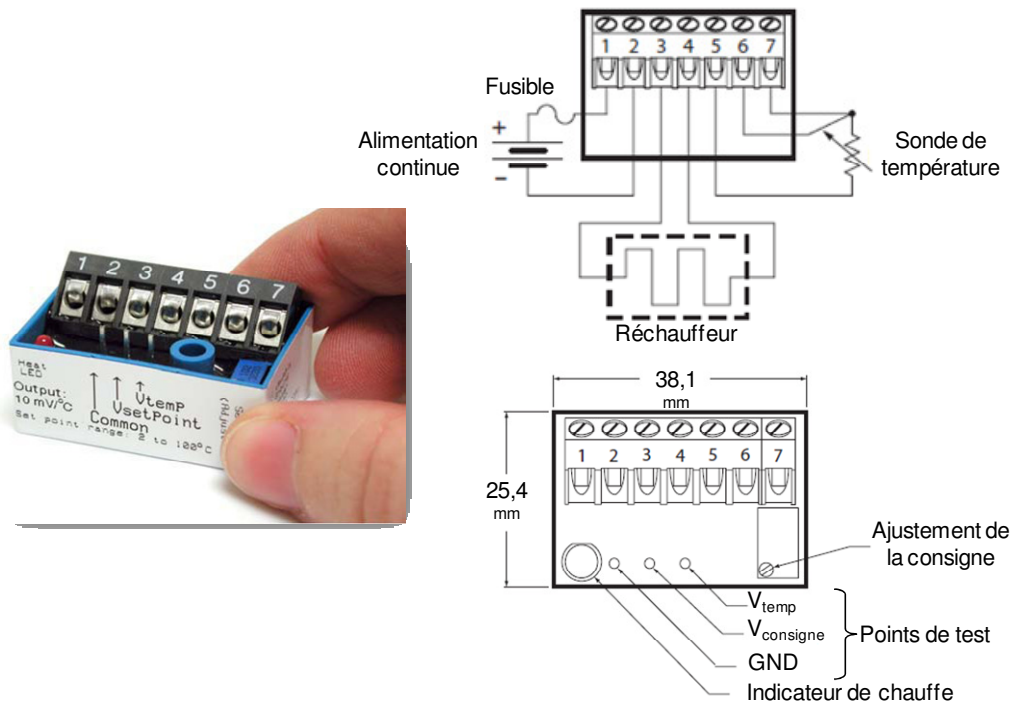


Figure IV-5 : Photographie et diagramme de fonctionnement du régulateur de température

Les électrovannes utilisées dans le système sont des vannes électromagnétiques miniatures développées par Lee Company. Ces vannes trois voies fonctionnent en utilisant un solénoïde permettant un verrouillage magnétique de la vanne vers un des deux ports d'entrée/sortie. La commutation vers l'un des ports est réalisée par une impulsion de courant (maximum de 10 ms) entre les deux terminaux de commande de la vanne et la polarité de la tension permet la sélection de la position (Figure IV-6). Les dimensions de l'électrovanne sont de 31,6 mm de longueur, 7,6 mm de large et 7,5 mm de hauteur et l'espace entre les ports est de 4,24 mm.



Les dimensions de ces électrovannes sont conçues pour obtenir un faible volume interne (72  $\mu\text{L}$ ) afin de limiter les volumes morts. Les électrovannes sont montées sur un support permettant la connexion avec des tubes afin de pouvoir les intégrer dans le système. L'étanchéité entre l'électrovanne et le support de connexion est réalisée à l'aide d'un joint et de deux vis de maintien.

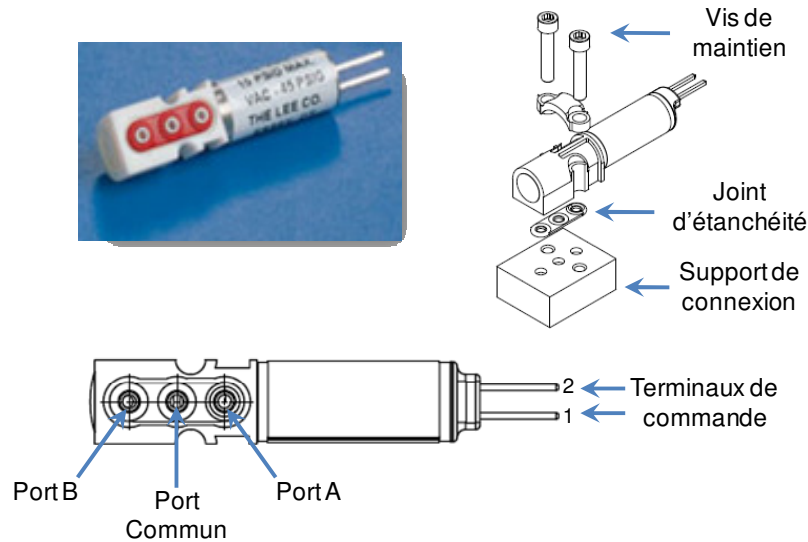


Figure IV-6 : Représentation des électrovannes du système

Les électrovannes sélectionnées sont commandées à partir d'une tension d'alimentation de  $\pm 12\text{V}$ . La table de commutation des électrovannes est présentée dans le Tableau IV-3.

Tableau IV-3 : Table de commutation des électrovannes

Polarité de l'impulsion de commande	Etat de la valve
Terminal 1 : (+) Terminal 2 : (-)	Commun - port A
Terminal 1 : (-) Terminal 2 : (+)	Commun - port B

## I.2 OUTILS DE PILOTAGE DU SYSTEME

### I.2.A Génération de signaux de commande

Le développement d'une carte de commande doit permettre une gestion de l'état des différents éléments du système afin de pouvoir les contrôler via un ordinateur. Un système sans fil développé par National Instruments permet de réaliser la liaison entre l'ordinateur de l'utilisateur du système et la carte de commande. Le système sans fil se compose ainsi de deux modules, un module de transmission d'informations et un nœud de mesure. Le module de transmission (NI WSN-9791 Ethernet Gateway) est une passerelle reliée à un ordinateur par un câble Ethernet qui permet la transmission des informations entre l'ordinateur de l'utilisateur et le nœud de mesure (NI WSN-3202 Node). Un signal radio à 2,4 GHz est utilisé pour transmettre l'envoi des données à distance via la passerelle Ethernet. Le driver NI-WSN permet la configuration du réseau grâce à NI Measurement & Automation Explorer (MAX) et l'extraction des données avec le logiciel NI LabVIEW (Figure IV-7).

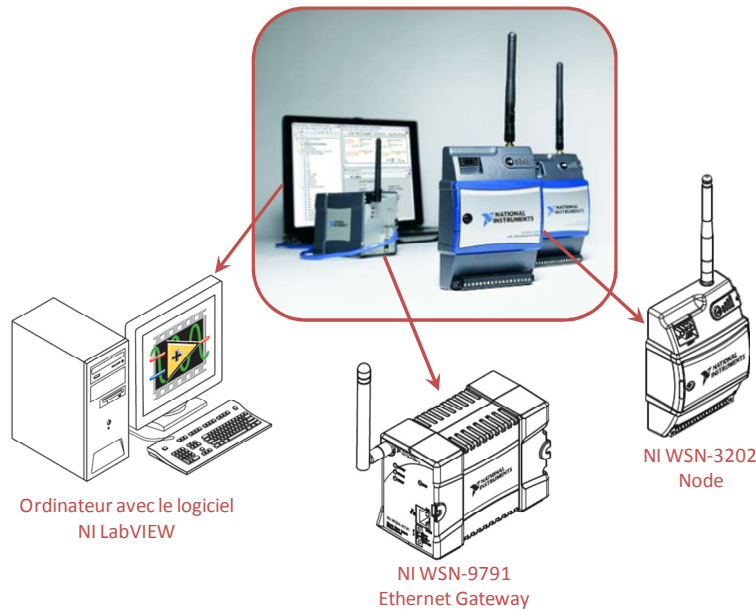


Figure IV-7 : Représentation du système de communication National Instrument

Le nœud de mesure déporté est donc directement relié à la carte de commande pour permettre de transmettre les informations d'état du système envoyées par l'utilisateur. Le nœud de mesure NI WSN-3202 est un matériel qui offre 4 entrées analogiques  $\pm 10$  V et 4 entrées numériques bidirectionnelles. Un connecteur à bornier à vis 18 broches fournit une connectivité directe aux différentes entrées du nœud. La carte de commande est donc conçue de façon à pouvoir générer différents états du système à l'aide des 4 bits d'entrées numériques (DIO 0 à DIO 3) du nœud de mesure configurées en mode écriture. Les informations transmises par les capteurs du module de détection sont acheminées vers l'utilisateur en utilisant les 4 entrées analogiques du nœud de mesure.

Les quatre entrées numériques sont des variables booléennes et peuvent donc être affectées d'un niveau logique (0 ou 1) par l'utilisateur. Les valeurs de tensions appliquées sur les entrées numériques du nœud de mesure sont configurées par les entrées DIO PWR et D GND du nœud de mesure. Dans notre cas, pour un niveau logique haut, DIO PWR est fixé à +5V et pour un niveau logique bas, D GND est relié à la masse. L'utilisation de ces quatre entrées numériques peut donc permettre de générer jusqu'à 16 états possibles pour le système.

Le logiciel LabVIEW permet par l'utilisation de variable partagée de forcer indépendamment chacune des entrées numériques du nœud de mesure. Ainsi, le Tableau IV-4 représente l'état du bus de commande en fonction de l'état du système suivant l'étape de l'analyse à effectuer.

Tableau IV-4 : Etat du bus de commande en fonction de l'étape d'analyse

Bus de commande				Etat du système
DIO 0	DIO 1	DIO 2	DIO 3	
0	0	0	0	Inactif
1	0	0	0	Concentration
0	1	0	0	Analyse molécule
1	1	0	0	Nettoyage capteurs

Le système comporte 4 états principaux constituant donc les différentes étapes de l'analyse qui peuvent donc être générés uniquement en utilisant deux des bits d'entrées numériques (DIO 0 et DIO 1). Les deux entrées numériques restantes (DIO 2 et DIO 3) seront utilisées ultérieurement dans l'étude afin de contrôler la régulation en température de la microcolonne et de permettre une mise au repos des signaux de commande des électrovannes.

La solution retenue pour générer les signaux d'état des différents éléments constituant le système consiste à utiliser une carte programmable (carte ACTEL) comme « décodeur » afin de générer différents signaux de commande à partir des niveaux logiques appliqués sur chacune des entrées numériques du nœud de mesure (Figure IV-8).

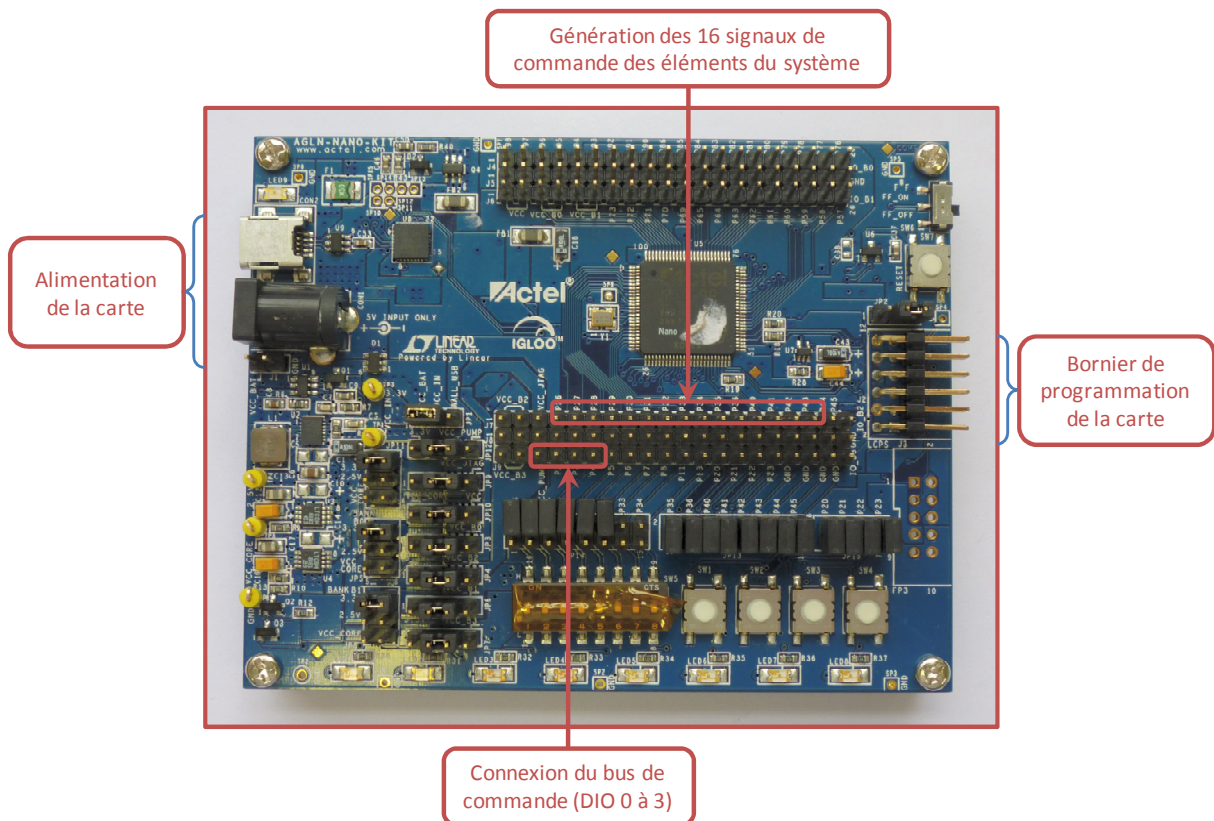


Figure IV-8 : Photographie de la carte ACTEL

La carte ACTEL fonctionnant à partir de signaux logiques représentés par des tensions de 0 et 3,3 V et la tension minimale pour générer un niveau logique haut sur le nœud de mesure étant de 5 V, un convertisseur de tension a été utilisé. Ce convertisseur 8 bits, le 74LVX4245, permet de convertir un bus de donnée 0 / 5 V en un bus de donnée 0 / 3,3 V et inversement.

Le schéma présenté en Figure IV-9 représente la partie génération des signaux de commande utilisée pour la conception de la carte de commande.

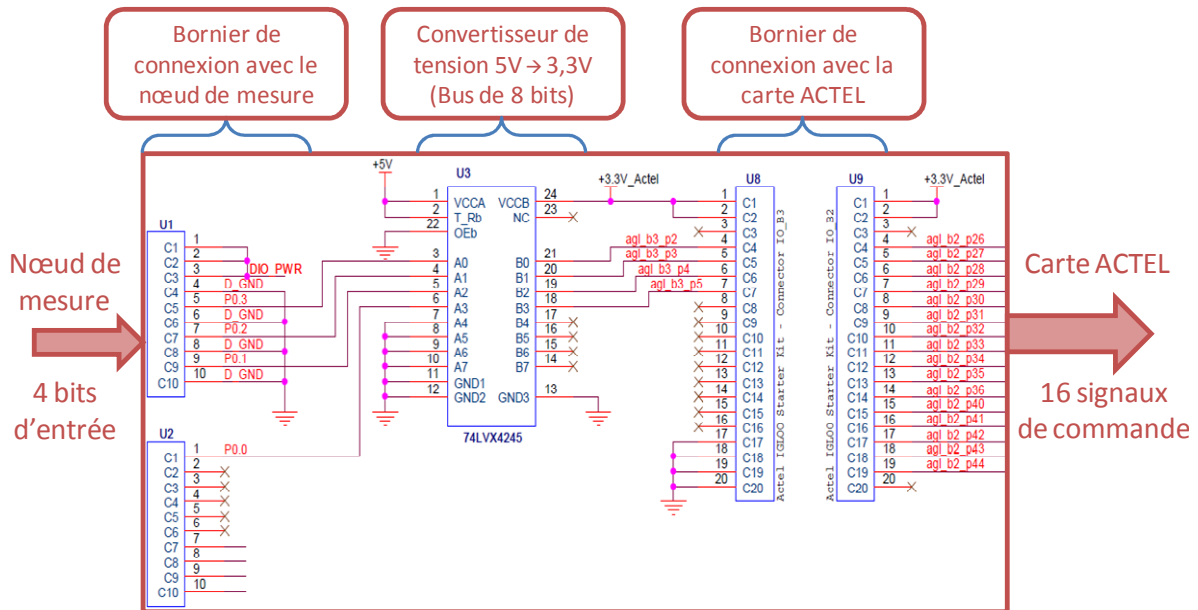


Figure IV-9 : Génération des signaux de commande

Lors de la conception de ce premier prototype, le système a été conçu de façon à être modulable notamment au niveau des éléments le constituant. Aussi, les cartes du système ont été développées afin de pouvoir commander jusqu'à 4 pompes et 4 électrovannes ainsi que les deux résistances chauffantes. Des signaux de commande générés par la carte ACTEL ont donc été associés pour ces différents éléments.

### I.2.B Contrôle des éléments du système

Les signaux de commande générés par la carte ACTEL forment un bus de données codées par des niveaux logique 0 ou 1 représentés respectivement par des tensions de 0 et 3,3 V. L'ensemble de ces signaux permettent de commander les électrovannes (+12 V ou -12 V), les résistances chauffantes (+24 V\_HEAT) et les pompes (+24 V\_PUMPS).

Les signaux de commande génèrent donc des tensions de 0 ou 3,3V qui permettent de valider l'application d'une tension de commande des différents éléments par l'utilisation de relais (DO061B). Ces composants fonctionnent donc comme des interrupteurs commandés par les signaux de la carte ACTEL. Les signaux de commande sont envoyés sur l'entrée de contrôle du relais (+CONTROL) permettant d'autoriser l'application d'une tension en sortie du relais (+LOAD ou -LOAD). Ces relais sont donc utilisés dans le système afin de pouvoir générer les tensions de commandes pour les électrovannes et les résistances chauffantes à partir des signaux de la carte ACTEL (Figure IV-10 et Figure IV-11).

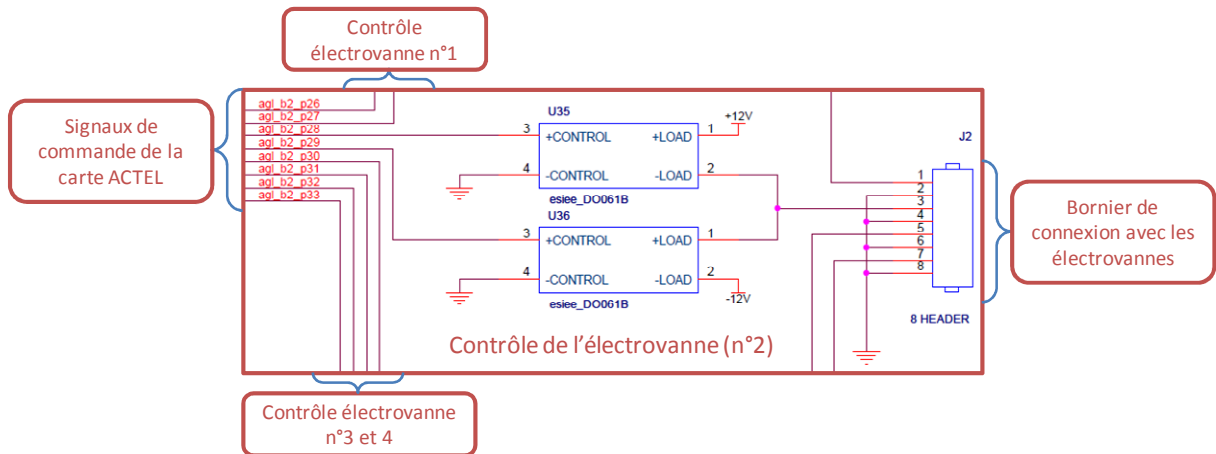


Figure IV-10 : Contrôle des électrovannes

Les électrovannes étant commandées par la polarité de la tension appliquée, deux relais sont nécessaires afin de les commander, un relais pour générer une polarité positive (+12 V), l'autre pour générer une polarité négative (-12 V). Lors du décodage par la carte ACTEL, l'utilisation de 2 signaux de commande complémentaires est donc nécessaire pour chacune des électrovannes (soit 8 signaux).

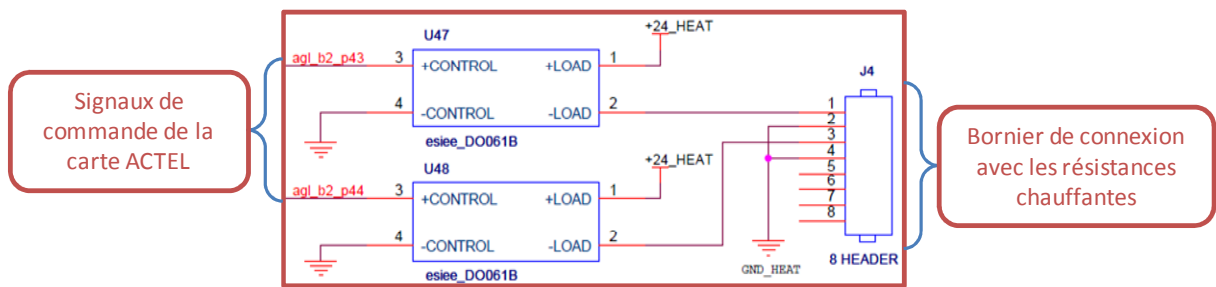


Figure IV-11 : Contrôle des résistances chauffantes

Les relais utilisés permettent d'utiliser un courant de charge allant jusqu'à 1 A. Cependant, concernant la commande des pompes, les courants nécessaires à leurs fonctionnements peuvent être importants, notamment l'impulsion de courant nécessaires au démarrage des pompes. Le choix d'utiliser un pont en H pour la commande des pompes a donc été retenu. Ce type de structure se retrouve dans plusieurs applications de l'électronique de puissance incluant le contrôle de moteurs. Le L298 est un composant permettant l'utilisation de haute tension (jusqu'à 46 V) et de forte intensité (jusqu'à 4 A) composé de deux ponts. Ces ponts peuvent être commandés individuellement par l'utilisation de deux entrées de validation. Un montage particulier des ponts consistant à mettre en parallèle les sorties pour l'utilisation de fort courant est utilisé pour la génération des signaux de contrôle des pompes (Figure IV-12).

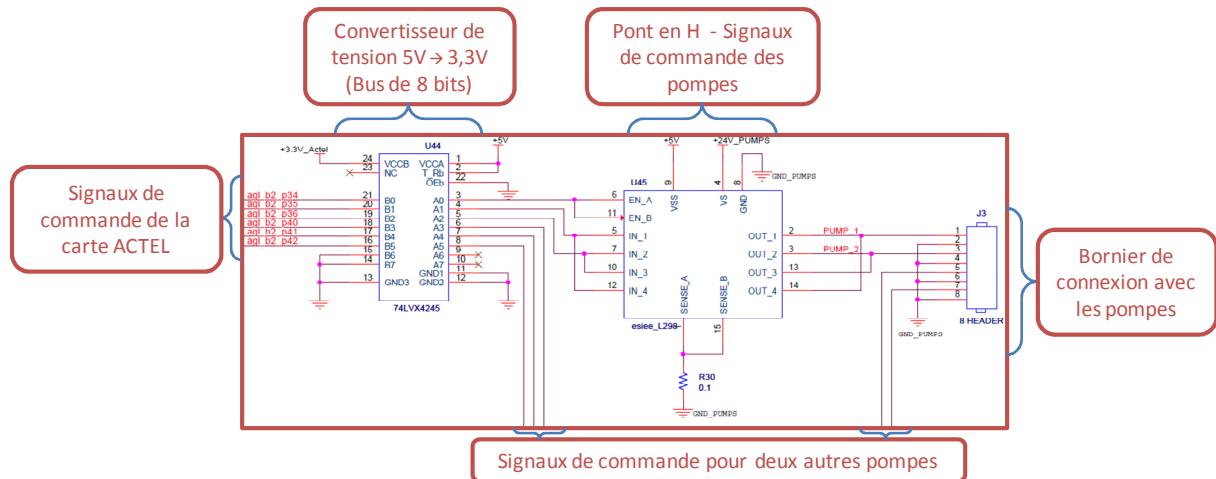


Figure IV-12 : Contrôle des pompes

### I.2.C Conception de la carte

Une dernière partie de la carte de commande consiste à générer les différentes alimentations utiles au fonctionnement de la carte. A partir d'une tension de +24 V et d'une de -24 V, cette partie de la carte permet de générer des tensions de +5 V, -5 V, +12 V, -12 V, +15 V et -15 V par l'utilisation de régulateur de tension. Le montage Figure IV-13 permet de générer les tensions +12 V et -12 V. Un montage identique est utilisé pour générer les autres tensions en utilisant les régulateurs adéquats. Ces tensions sont également utilisées pour l'alimentation de la carte développée pour les capteurs.

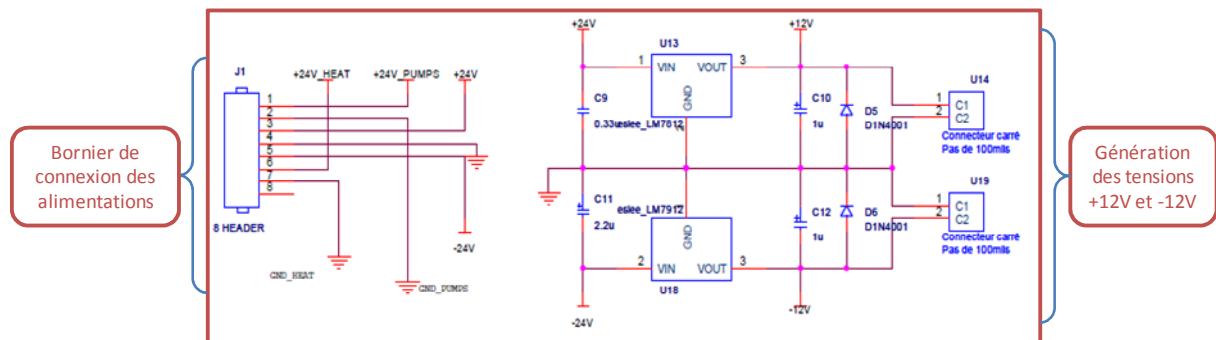


Figure IV-13 : Génération des alimentations de la carte de commande

Les schémas de montages des différentes parties de la carte de commande présentés dans les figures précédentes (Figure IV-9 à Figure IV-13) ont été développés sous Cadence Allegro Design Entry. L'ensemble des montages est regroupé afin de former la carte de commande et de pouvoir les intégrer à l'aide de l'outil cadence Allegro PCB Design pour le développement de la carte. Allegro PCB Design permet le placement et le routage entre les différents composants de la carte en intégrant toutes les liaisons définies sous l'outil de développement de schéma Cadence Allegro Design Entry. Ainsi, la carte de commande développée est une carte double face regroupant les différentes parties développées précédemment (Figure IV-14).



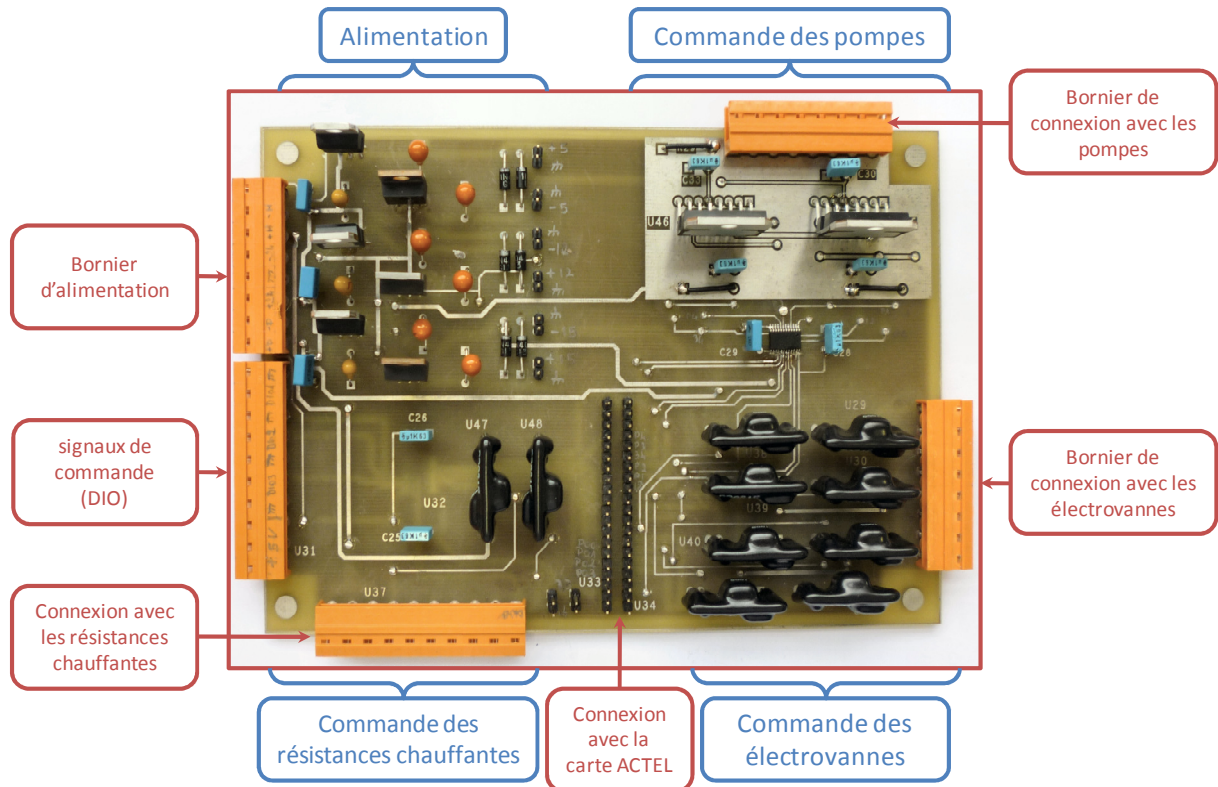


Figure IV-14 : Photographie de la carte de commande

A partir des 4 entrées numériques du nœud de mesure (bus de commande), la carte ACTEL permet donc de générer 16 signaux de commande (bus de donnée) permettant ainsi de commander jusqu'à 4 pompes, 4 électrovannes et 2 résistances chauffantes. Une table de décodage peut ainsi être programmée dans la carte ACTEL en fonction des différentes valeurs pouvant être prises par le bus de commande.

La table de décodage se compose donc simplement du bus de commande de 4 bits (DIO 0, DIO 1, DIO2 et DIO 3) et du bus de donnée composé de 8 signaux pour la commande de 4 électrovannes, 6 signaux pour la commande de 4 pompes et 2 signaux pour la commande de deux résistances chauffantes (Figure IV-15).

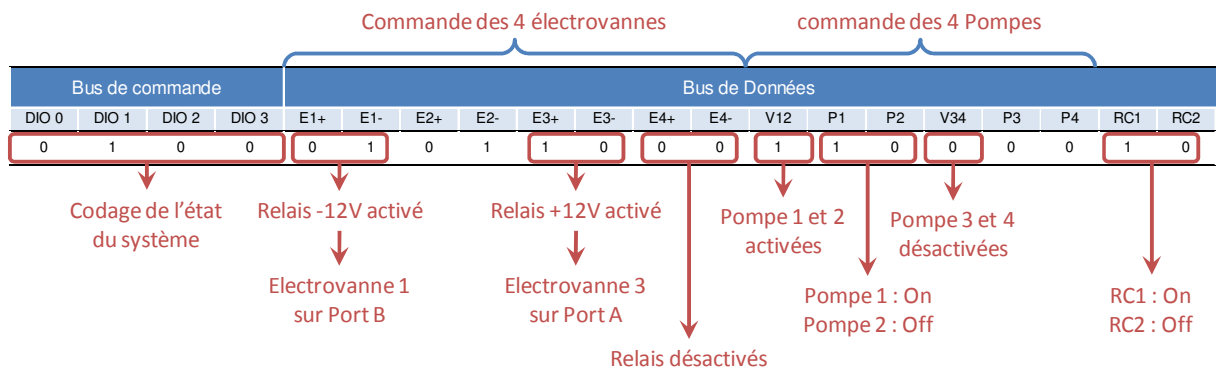


Figure IV-15 : Exemple de décodage par la carte ACTEL en fonction d'un état du système

### I.3 INTERFACE UTILISATEUR

#### I.3.A Organigramme de fonctionnement

Une fois la carte de commande développée, la gestion des signaux de commande doit-être définie ainsi que le cadencement des étapes de l'analyse. Pour cela, le Module Pioneer LabVIEW Wireless Sensor Network (WSN), permet une programmation graphique sous le logiciel LabVIEW pour personnaliser le comportement du nœud.

Ce logiciel LabVIEW est un environnement de programmation graphique utilisé pour développer des systèmes de mesure, de test et de contrôle en assemblant des icônes graphiques et des fils à la manière d'un organigramme. LabVIEW intègre des fonctions d'analyse et de visualisation des données, le tout permettant de créer des systèmes d'instrumentation virtuelle.

Le logiciel se décompose sous deux fenêtres de travail, une fenêtre de programmation graphique appelée face arrière et une fenêtre permettant d'implémenter l'interface pour l'utilisation appelée face avant. Les objets définis sur la face avant sont intégrés sous forme d'icône dans la face arrière afin de permettre de définir le comportement du système en fonction des actions effectuées sur l'interface utilisateur.

Pour la conception du système, les entrées numériques du nœud de mesure forment donc un bus de commande des états du système composé de 4 bits. Le Tableau IV-1 présenté précédemment, permet de définir 4 états possibles du système en fonction des étapes de l'analyse. Ces 4 états correspondent donc à un comportement précis du système à un instant T de l'analyse et permettent donc de définir un état binaire pour l'état des différents éléments composant le système par l'intermédiaire de signaux de commande de la carte.

La programmation sous Labview permet de définir le cadencement de l'analyse par un changement de l'état du système en agissant sur la valeur du bus de commande composé des 4 entrées numériques du système et de permettre une visualisation graphique de l'état des différents éléments du système, le comportement physique étant géré par la carte de commande. La passerelle de transmission (NI WSN-9791 Ethernet Gateway) reliée à l'ordinateur de l'utilisateur est configurée pour permettre une acquisition de la valeur du bus de commande (DIO 0 à DIO 3) par le nœud de mesure toutes les 100 ms.

L'interface utilisateur se compose donc des paramètres d'entrée du système et des objets graphiques permettant la visualisation de l'état du système. Les paramètres d'entrée tels que le temps de prélèvement et le nombre de molécule permettent ainsi de définir le cadencement des différentes phases d'analyse. Ainsi un organigramme regroupant les différentes étapes de l'analyse peut-être défini en fonction de ces différents paramètres (Figure IV-16).

La programmation sur face arrière du logiciel consiste d'une part, à faire varier l'état du bus de commande et donc du nœud de mesure en fonction de l'étape de l'analyse à effectuer et d'autre part, à permettre la visualisation de l'état du système en affectant les valeurs correspondantes aux différents objets graphiques de l'interface utilisateur.



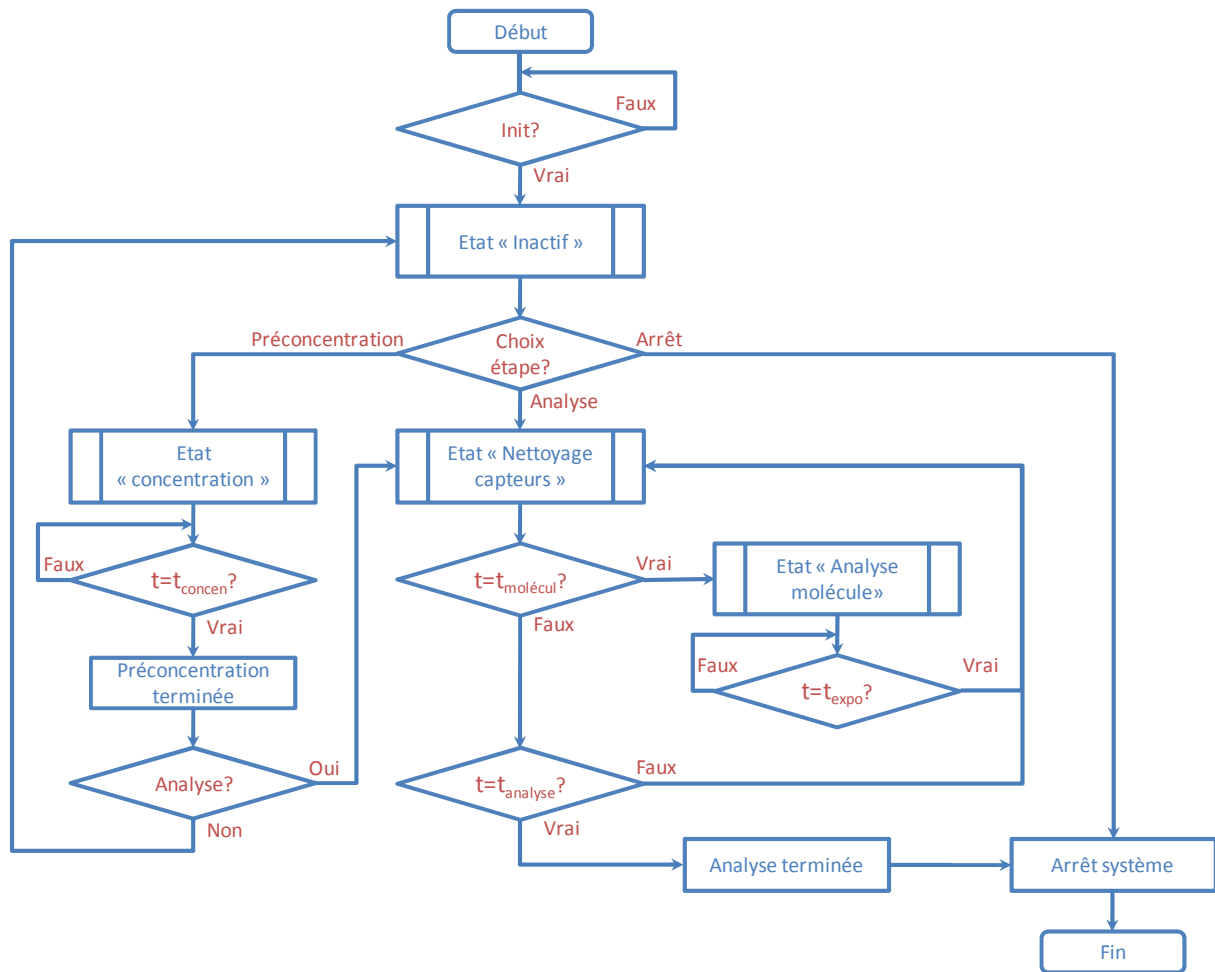


Figure IV-16 : Organigramme de fonctionnement du système d'analyse

L'organigramme s'organise autour des 4 états possibles du système (« inactif », « concentration », « analyse molécule » et « nettoyage capteurs ») décrits précédemment et générés par les deux bits d'entrée numériques DIO 0 et DIO 1. Dans les « sous-programmes » correspondant à chacun de ces états, deux actions sont effectuées : l'état des entrées numériques du bus de commande est transmis au nœud de mesure et les valeurs correspondantes à l'état des éléments du système sont affectées aux objets graphiques les représentants.

Les entrées numériques DIO 2 et DIO 3 n'étant pas utilisées pour définir un état du système, celles-ci permettent de contrôler la régulation en température de la microcolonne et la mise au repos des signaux de commande des électrovannes.

Les résistances chauffantes sont utilisées lors de la phase d'analyse afin de libérer les molécules piégées dans le module de préconcentration et de réguler la température du module de séparation. Aussi, si la chauffe du module de préconcentration ne nécessite pas une régulation contrôlée, celle-ci devant être réalisée le plus rapidement possible, la régulation en température du module de séparation peut influencer sur le temps de rétention des molécules. L'entrée numérique DIO 2 n'étant pas utilisée pour définir une des phases d'analyse du système, celle-ci a été utilisée afin de contrôler la vitesse de chauffe du module de séparation en mode tout ou rien. Les changements d'états de l'entrée DIO 2, et donc de la commande de chauffe du module sont définis par un signal carré dont le rapport cyclique permet de créer virtuellement une rampe de température contrôlée.

La commande d'une électrovanne est réalisée par l'utilisation de deux relais complémentaires afin de pouvoir générer un état de commande soit de +12 V, soit -12 V selon le relais actionné. Une impulsion de commande est nécessaire pour faire basculer chacune des électrovannes en fonction de la polarité appliquée sur les entrées de commande.

Lorsque le système change d'état, un des relais est donc activé afin d'appliquer une polarité sur l'entrée de commande de chacune des électrovannes. Afin de ne pas endommager les électrovannes, cette tension de commande ne doit pas rester appliquée en continu sur l'entrée de commande. Aussi, suite à un changement d'état du système, l'entrée numérique DIO 3 est forcée à l'état 1 afin de désactiver l'ensemble des relais commandant les électrovannes. Les signaux de commande des électrovannes sont alors tous à l'état de repos (aucune tension appliquée) jusqu'au prochain changement d'état du système.

La durée de l'impulsion ainsi générée est définie par le temps écoulé entre le changement d'état du système et la mise à l'état 1 de l'entrée numérique DIO 3. Le temps nécessaire entre deux acquisitions de la valeur du bus de commande (DIO 0 à DIO 3) par le nœud de mesure étant de 100 ms, une temporisation de 200 ms a été définie entre le changement d'état du système et la mise à l'état 1 de la commande de repos (DIO 3) afin de s'assurer que les deux changements d'état du bus de commande soient bien pris en compte par le système.

Ainsi, le Tableau IV-5 présente la table de commande définie pour contrôler l'ensemble des éléments du système en fonction des étapes de l'analyse.

Tableau IV-5 : Table de commande du système

Bus de commande				Etat du système	Vanne			Pompe	Résistances chauffantes	
DIO 0	DIO 1	DIO 2	DIO 3		n°1	n°2	n°3		RC1	RC2
0	0	0	0	Inactif	-12V	-12V	-12V	Off	Off	Off
1	0	0	0	Concentration	+12V	+12V	-12V	On	Off	Off
0	1	0	0	Nettoyage capteurs	-12V	-12V	-12V	On	On	X
1	1	0	0	Analyse molécule	-12V	-12V	+12V	On	On	X
X	X	0	X	Commande de Chauffe RC2	X	X	X	X	X	Off
X	X	1	X		X	X	X	X	X	On
X	X	X	0	Repos Commande électrovanne	+/-12V	+/-12V	+/-12V	X	X	X
X	X	X	1		0V	0V	0V	X	X	X

\* un X correspond à un état quelconque du signal

### I.3.B Conception de l'interface utilisateur

Suite à la phase d'initialisation du système qui consiste à remettre à zéro tous les éléments graphiques du système modifiés lors d'une précédente analyse, un menu de sélection permet de choisir la phase de l'analyse que l'utilisateur souhaite effectuer modifiant ainsi l'état du système. Ce menu de sélection est ainsi retrouvé sur l'interface de la face avant permettant à l'utilisateur d'interagir avec le système.

L'état des éléments du système (vannes, pompes et résistances chauffantes) en fonction des différentes étapes est répertorié dans le Tableau IV-1. Les objets graphiques de visualisation de ces éléments sont donc affectés par des valeurs binaires permettant d'observer leurs évolutions au cours des différentes phases de l'analyse.

Les différents paramètres d'entrée du système retrouvés dans l'organigramme permettent de définir le cadencement des étapes de l'analyse.

Les deux premiers paramètres concernent donc le temps de prélèvement ( $t_{\text{concen}}$ ) lors de la phase de concentration de l'échantillon et le temps nécessaire pour l'analyse de l'échantillon ( $t_{\text{analyse}}$ ). Ces deux paramètres sont réglables par l'utilisateur à l'aide de boutons de contrôle sur l'interface utilisateur.

Le paramètre suivant concerne la gestion du système lors de l'analyse de l'échantillon. En effet lors de cette phase, le système peut se retrouver dans deux états, l'état de « nettoyage des capteurs » et l'état d'« analyse des molécules ». Lors de la phase d'initialisation, le système permet de définir le nombre de molécules qui devront être analysées en leur associant leurs temps de rétention ( $t_{\text{molécul}}$ ) et un temps d'exposition ( $t_{\text{expo}}$ ), c'est-à-dire le temps où le système permet d'envoyer les molécules retenues vers le module de détection.

Ces données sont répertoriées dans un tableau et la comparaison entre le chronomètre associé au temps d'analyse de l'échantillon et les temps de rétention des molécules, permet de faire basculer le système dans l'état « analyse molécule » durant le temps d'exposition associé à la molécule.

La programmation de cet organigramme est donc développée sur la face arrière du logiciel LabVIEW à l'aide d'icônes représentant chacun des paramètres d'entrées. L'ensemble des éléments définis précédemment forme une interface graphique sur la face avant avec laquelle l'utilisateur peut interagir pour modifier le comportement du système. L'interface utilisateur ainsi développée est présentée en Figure IV-17. Cette figure représente l'état de l'interface utilisateur lors de la phase d'analyse.

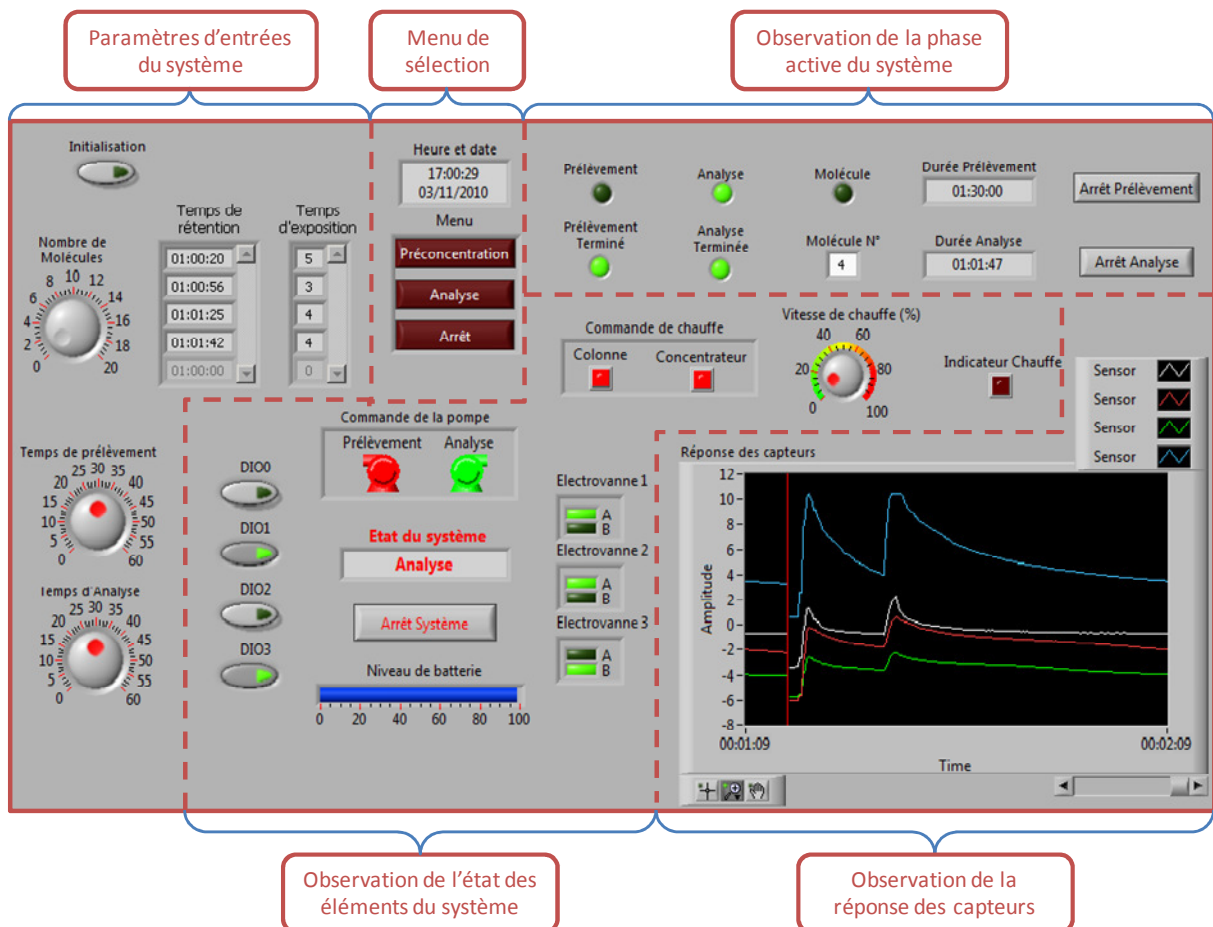


Figure IV-17 : Présentation de l'interface utilisateur

## II CARACTERISATION DU SYSTEME D'ANALYSE

### II.1 ASSEMBLAGE DU SYSTEME

Une fois les différents éléments composant le système définis et les cartes de commande développées, l'ensemble du système est assemblé sur des supports en PMMA. Le premier support se compose du nœud de mesure NI WSN-3202, de la carte de commande, de la carte ACTEL, de la carte de traitement des signaux des capteurs et des deux régulateurs de température CT325.

Le second support se compose des électrovannes, des modules de concentration et de séparation avec leurs montages comprenant les résistances chauffantes et du module de détection. Les tubes Tenax utilisés comme filtre dans le système sont également présents sur ce support. Ce second support est placé au dessus de celui composé de l'ensemble des cartes afin de faciliter les connexions entre les modules et les borniers de connexion des cartes (Figure IV-18).

Dans ce premier prototype, la pompe est placée sur un support indépendant afin d'éviter les vibrations sur les différents éléments du système.

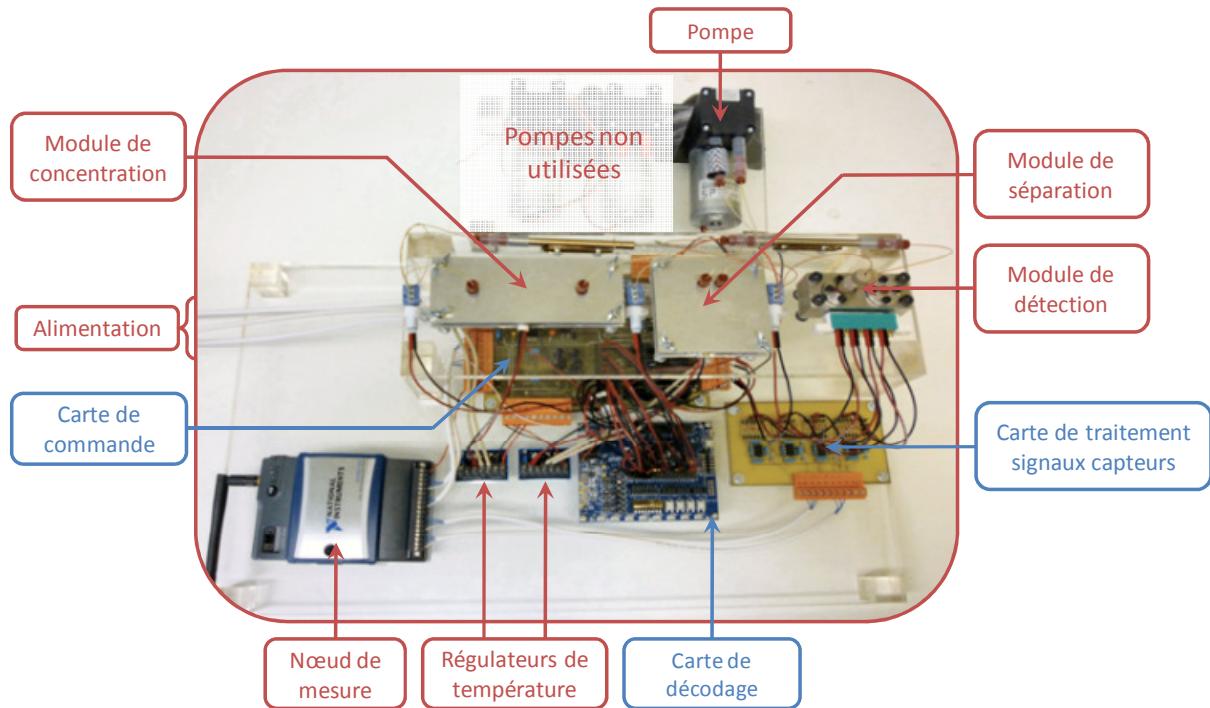


Figure IV-18 : Photographie du prototype du système d'analyse

### II.2 CARACTERISATION DES PARAMETRES DE FONCTIONNEMENT DU SYSTEME

#### II.2.A Caractérisation des débits

La pompe permet d'obtenir des débits relativement important lorsque celle-ci fonctionne à vide. Ces caractéristiques ont été choisies afin de permettre un fonctionnement impliquant de fortes pertes de charge générées par l'utilisation de microcanaux. En chromatographie, le débit est un paramètre important dans le procédé de séparation. Ainsi, des mesures du débit généré par la pompe ont été effectuées avec les différentes pertes charges imposées par les éléments du système. Pour différentes tension d'alimentation de la pompe, des mesures de débits ont été réalisées en trois points de la chaîne d'analyse (Figure IV-19).

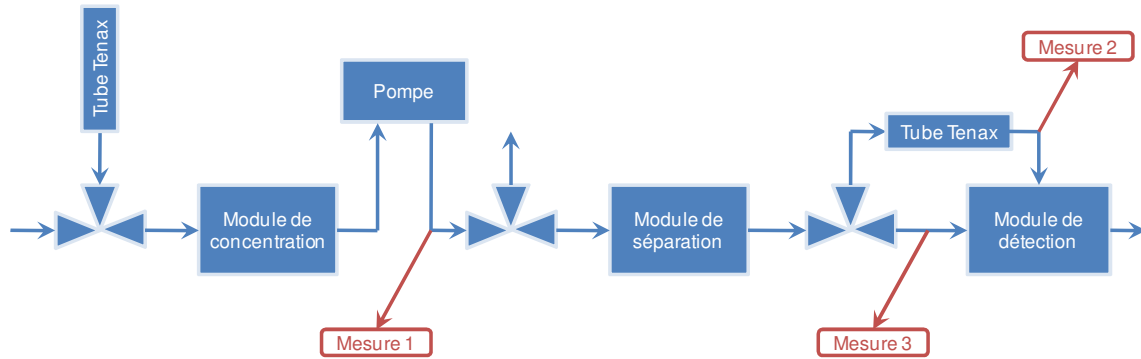


Figure IV-19 : Mesure des débits dans la chaîne d'analyse

La première mesure de débit concerne le débit de prélèvement lors de l'étape de concentration de l'échantillon (Figure IV-20). Afin de limiter le temps de prélèvement, ce débit doit être le plus important possible cependant l'utilisation de microcanaux limite le débit maximal pouvant circuler dans la chaîne d'analyse. Ainsi, une caractérisation du débit de prélèvement a été réalisée avec un débitmètre à bulle pour différentes tensions d'alimentation de la pompe.

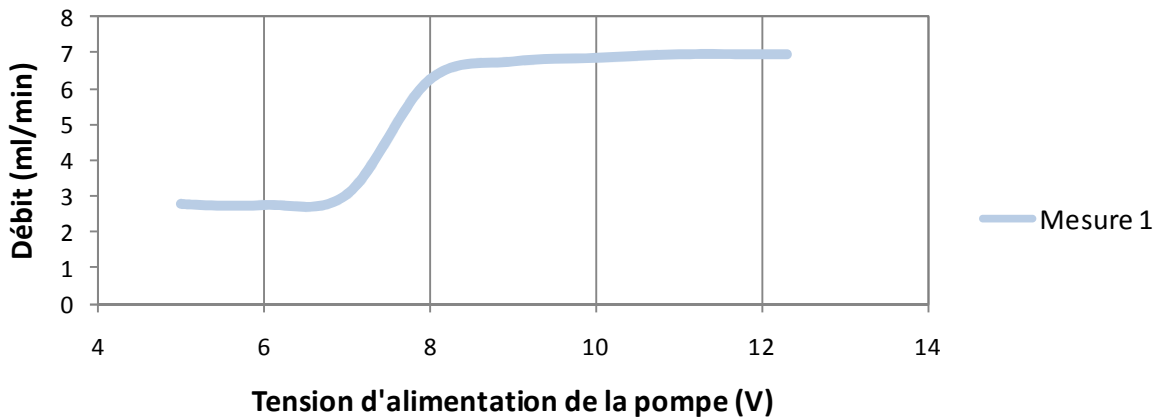


Figure IV-20 : Mesure du débit de prélèvement

Un palier induit par l'utilisation des microcanaux est observé pour une tension d'alimentation supérieure à 8 V. Le débit de prélèvement maximal est donc de 7 mL/min. La tension d'alimentation retenue est de 12 V permettant ainsi au système de conserver un débit de prélèvement identique en cas de pertes de charge supplémentaires engendrées par le prélèvement de particules par exemple.

Les deux autres mesures concernent les débits dans le système lorsque celui-ci est dans une étape de nettoyage des capteurs (mesure 2) ou dans l'étape d'analyse des molécules (mesure 3). La principale différence entre ces deux mesures provient du filtre (tube Tenax) utilisé en amont du module de détection afin de permettre un passage d'air propre entre les phases d'analyse des molécules d'intérêt (Figure IV-21). L'utilisation de microstructures impose des débits relativement faibles (quelques millilitres par minute), ainsi les mesures de débit ont été réalisées à l'aide d'un débitmètre à bulles.

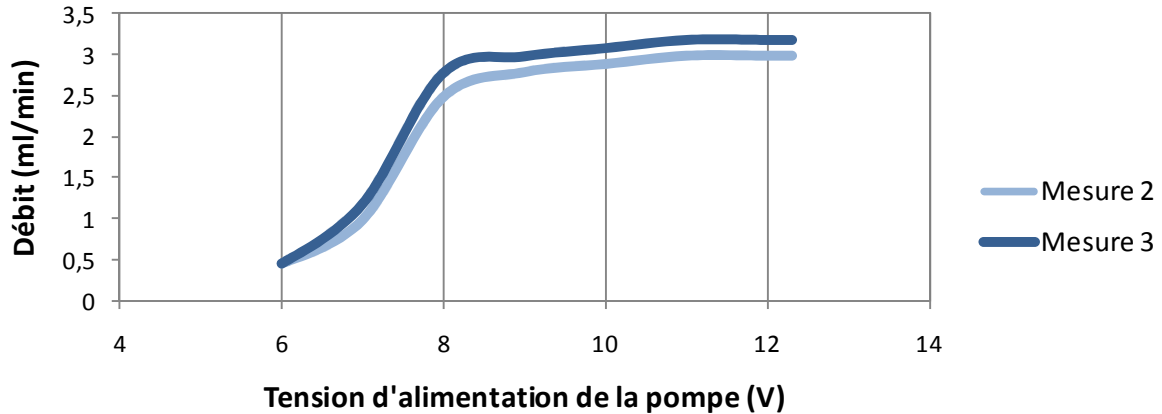


Figure IV-21 : Mesure des débits d'analyse

Pour les deux mesures, une tension minimale de 6 V est nécessaire afin de permettre un passage de l'air à travers l'ensemble de la chaîne d'analyse. Comme pour la mesure du débit de prélèvement, un palier est observé pour une tension d'alimentation supérieure à 8 V et un débit maximal de 3 ml/min est atteint. La différence de débit (0,2 mL/min en moyenne) observée entre les deux mesures peut être expliquée par la présence du filtre lors de la phase de nettoyage des capteurs.

## II.2.B Caractérisation des rampes de température

Une caractérisation des rampes de température est également réalisée pour chacune des microstructures de concentration et de séparation. La température maximale ajustée par le point de consigne des régulateurs est de 140°C.

Concernant la microstructure de concentration, cette température de consigne doit être obtenue le plus rapidement possible afin de libérer les molécules retenues dans un délai de temps le plus court possible. Une caractérisation des rampes de température obtenues pour différentes tension d'alimentations, et donc de puissance injectée à la résistance chauffante a donc été réalisée (Figure IV-22).

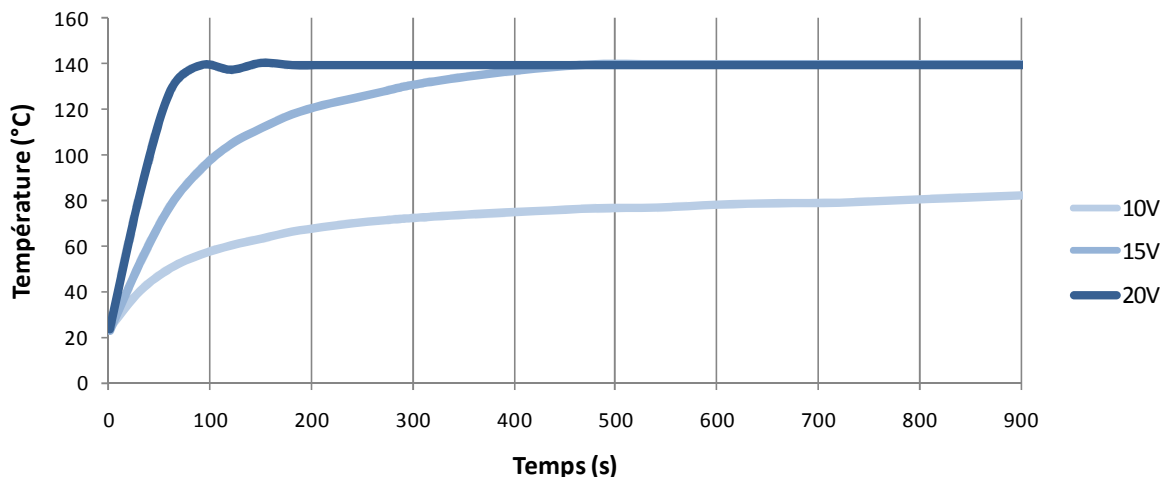


Figure IV-22 : Rampe de température de la microstructure de concentration

Afin d'obtenir la rampe de température la plus rapide possible dans ce premier prototype, la tension d'alimentation retenue est 20 V. La résistance chauffante utilisée pour la microstructure de concentration ayant une résistance nominale de 21,2  $\Omega$ , le courant consommé pour une tension de 20 V est d'environ 0,94 A, soit une puissance consommée de 18,8 W.

Une tension d'alimentation supérieure permettrait certainement d'augmenter l'efficacité de chauffe cependant la puissance consommée serait encore plus importante. De plus, les relais utilisés pour les commandes de chauffe impliquent de limiter la consommation de courant à 1 A.

La température appliquée sur la microstructure de séparation peut influencer sur le temps de rétention des molécules. Le système a donc été conçu afin de pouvoir contrôler la vitesse de chauffe du module de séparation en créant une rampe de température par une alimentation en mode tout ou rien du régulateur.

Pour cela, une des entrées numériques (DIO 2) permet de contrôler directement le relais de commande de la résistance chauffante de la microcolonne (RC2). Les changements d'états de l'entrée DIO 2, et donc de la commande de chauffe du module sont définis par un signal carré dont le rapport cyclique permet de modifier l'inclinaison de la rampe et donc la vitesse de chauffe. La fréquence du signal est fixée à 0,25 Hz soit une période de 4 secondes. Lorsque le signal est à l'état haut, la commande de chauffe est activée, lorsque le signal est à l'état bas, la commande est au repos. Une caractérisation des rampes de température obtenues à partir d'une tension d'alimentation de 20 V a été réalisée pour différentes valeurs du rapport cyclique (Figure IV-23).

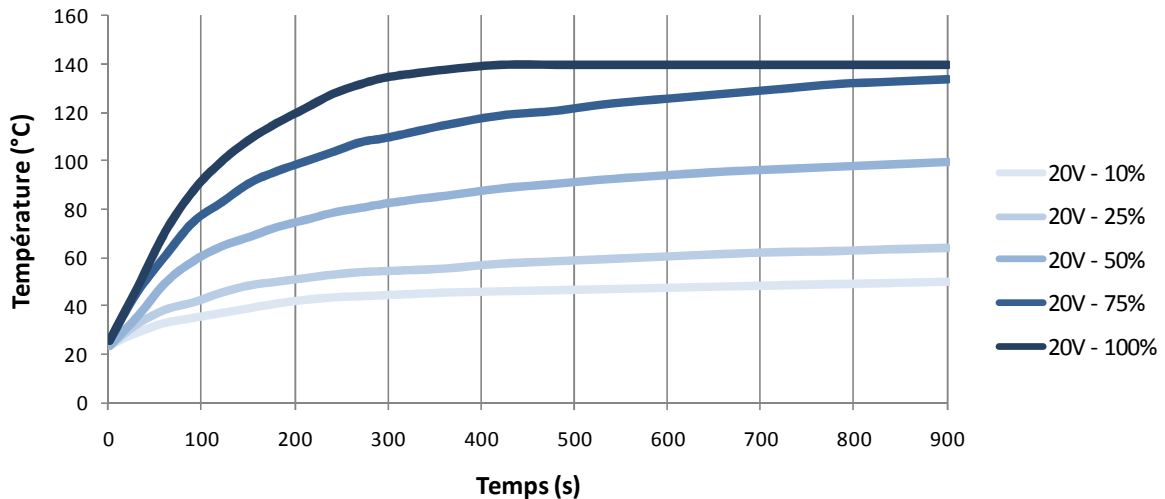


Figure IV-23 : Rampe de température de la microstructure de séparation

Les essais réalisés lors de la caractérisation de la microcolonne ont montré qu'une température de 40°C suffit pour séparer les molécules d'intérêt. Dans les premiers temps de l'analyse, la rampe de température ne doit donc pas être trop importante afin d'obtenir une efficacité de séparation optimale. La valeur du rapport cyclique est donc fixée à 10 %.

Afin de permettre la libération des molécules nécessitant une température plus importante et donc permettre le nettoyage de la microcolonne, celle-ci doit atteindre la température de consigne maximale. Le système permet une augmentation manuelle de la valeur du rapport cyclique afin d'accélérer le processus de chauffe jusqu'à la température de consigne suite au passage de la dernière molécule d'intérêt.

La résistance chauffante utilisée pour la microstructure de séparation ayant une résistance nominale de 23,2  $\Omega$ , le courant consommé pour une tension de 20 V est d'environ 0,86 A, soit une puissance consommée de 17,2 W lorsque la commande de chauffe est activée.



### III DISCUSSION SUR LE MICROSYSTEME D'ANALYSE

Les modules développés dans cette étude permettent d'envisager une détection rapide d'un développement fongique dans un environnement intérieur. Cette caractéristique couplée aux avantages apportés par l'indice de contamination fongique (détection des contaminations cachées) en fait un outil pertinent pour la surveillance de la qualité microbiologique des espaces clos. De plus, la modularité du système, avec notamment la possibilité de moduler les temps de rétentions d'intérêts et donc la nature des COV à analyser, permet son utilisation pour différents cas de contaminations microbiennes ou chimiques.

Pour des raisons d'encombrements, le gaz vecteur utilisé n'est pas issu d'une bouteille de gaz purifié, mais d'un air filtré avec du Tenax TA. Le choix du même adsorbant pour la filtration et le prélèvement permet de s'affranchir de composés parasites puisque les molécules non retenues par l'étape de filtration, ne sont également pas retenues lors du prélèvement. L'obtention, lors de nos essais, d'un blanc stable permet de valider cette hypothèse.

Suite aux développements des trois modules principaux, des cartes de commandes ont été réalisées afin de contrôler les différents éléments composant le système. Le système est ainsi commandé via un module sans fil permettant la gestion des états de la pompe, des trois électrovannes et des deux résistances chauffantes ainsi que l'acquisition des informations transmises par le module de détection. Afin de réaliser les différentes étapes nécessaires à l'analyse des composés d'un échantillon d'air, l'interface utilisateur développée sous Labview permet la gestion et le contrôle de l'état du système durant l'analyse. La modularité de cet environnement de programmation graphique, bien que trop complexe pour un système intégré, permet ici la multiplication des essais et ainsi le paramétrage de ce prototype.

Les mesures de débit à différents points de la chaîne ainsi que la caractérisation des rampes de températures permettent de placer les modules dans les conditions de validations utilisées lors de leurs caractérisations. Si les limites du module de détection (temps de réponse et méthode de mesure des variations des couches sensibles) ne permettent pas, pour le moment, son utilisation en sortie du système, en revanche, la validation de chacun des modules et la caractérisation des paramètres de fonctionnement (débit, température...) démontre la faisabilité d'un tel système.

De plus, un travail de thèse est engagé depuis 2009 sur l'étude et la compréhension des mécanismes d'adsorption des Composés Organiques Volatils par les couches polymères. Ainsi, dans la continuité de ce travail, différentes solutions sont envisagées concernant les aspects optimisation du module de détection. D'une part, une étude approfondie concernant l'influence de la géométrie des électrodes et de la morphologie des films polymères sur la réactivité des capteurs doit permettre l'obtention d'un temps de réponse adapté. En effet, Hamilton *et al.* (2005) ainsi que Li *et al.* (2007) montrent que la sensibilité et la sélectivité des films polymères dépendent de leurs morphologies (Hamilton *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2007a). D'autre part, différentes stratégies de mesures seront élaborées afin de permettre la détection rapide de faibles variations de résistivité des couches sensibles.

Les conditions expérimentales de débit et de température des modules de prétraitement seront alors optimisées afin de permettre une exposition optimale des couches sensibles aux COV d'origine fongique en sortie du système.





## DISCUSSION GENERALE

La croissance fongique s'accompagne de l'émission de COV. Certains de ces composés peuvent être choisis comme traceurs de cette croissance. Afin de détecter la présence d'une contamination, le CSTB a construit un indice basé sur ces traceurs, permettant leur utilisation dans des environnements intérieurs.

Dans la continuité de ces travaux, le principal objectif de cette thèse a consisté à étudier et élaborer un microsystème d'analyse de l'air destiné à la détection rapide d'un développement fongique dans les espaces clos en s'appuyant sur cette méthode.

Pour répondre à cet objectif, le premier axe de notre démarche a été de développer la base de traceurs existante et de définir une stratégie d'échantillonnage adaptée à des environnements recevant du public tel que les musées.

L'identification de 15 nouveaux traceurs à partir de 8 nouvelles souches environnementales colonisant usuellement les sites patrimoniaux a donc permis d'implémenter la base de données existante (Moularat, 2005). L'indice de contamination fongique a ainsi été favorablement étendu. Ces nouveaux traceurs sont spécifiques des espèces et/ou des supports contaminés. En effet, la dépendance de certaines de ces molécules vis-à-vis du matériau colonisé a été constatée par différents auteurs (Wilkins et Larsen, 1995; Sunesson *et al.*, 1996; Korpi *et al.*, 1998; Moularat *et al.*, 2008b).

Par ailleurs, il s'agit de composés comprenant entre 4 et 16 atomes de carbone. Ces résultats expérimentaux sont en adéquation avec les observations de Wilkins (2002), montrant que les composés spécifiques d'un développement fongique sont des molécules dont la chaîne carbonée varie de C2 à C20.

La validation *in situ* des différents indices a permis d'éprouver leurs applications à divers types d'environnements (Châteaux, musées, bibliothèques, grottes ornées...) en détectant l'ensemble des cas de contaminations. L'identification de cibles spécifiques a permis la localisation de sources de contamination en incriminant le type de matériau contaminé. Ainsi, une contamination sur du tissu a été mise en évidence dans un musée par la détection d'une des cibles spécifiques du lin.

L'utilisation de ces indices permet par ailleurs de mettre en place une procédure de surveillance de contamination puisqu'il a été démontré que ces traceurs sont détectables dès le deuxième jour de développement fongique (Wessen *et al.*, 1995; Korpi *et al.*, 1999; Wilkins, 2002; Moularat *et al.*, 2008c).

Outre la détection de contamination, les essais réalisés ont permis d'éprouver les indices au contrôle de la remédiation d'environnements anciennement contaminés. Ainsi, l'absence de traceurs fongiques suite à l'arrêt d'un développement fongique a été vérifiée, puisque l'absence de la persistance des traceurs dans un environnement a été observée. De plus, les traitements chimiques mis-en-œuvre pour éliminer une contamination (château de Champs-sur-Marne, Grotte de Lascaux) n'ont pas interféré dans le calcul de l'indice.

Par ailleurs, ces divers essais ont permis de définir une stratégie d'échantillonnage. Il a donc été établi qu'un unique prélèvement par salle était suffisant pour déterminer la présence d'une contamination fongique.

Le second axe de notre recherche a consisté à concevoir les micromodules d'un microsystème dédié à l'analyse de ces COV cibles. A partir des résultats obtenus dans la première partie,

différentes conditions ont été prises en compte pour la conception du microsystème. Ainsi, si l'utilisation de systèmes multi-capteurs permet un échantillonnage simple et rapide pour la détection et l'identification de composés volatils, en revanche, malgré la maîtrise des procédés de fabrication, la sélectivité des couches sensibles des différentes technologies de capteurs disponibles reste insuffisante pour la détection d'un composé dans un mélange complexe. Outre les caractéristiques intrinsèques des systèmes multi-capteurs existants, les mesures réalisées avec ces systèmes sont relatives à un environnement de référence. Cette constatation ne rend pas directement possible leur utilisation pour des mesures *in situ* où un environnement de référence stable est impossible à obtenir (cas d'un logement par exemple). De plus, les concentrations en COV fongiques dans un environnement réel sont difficiles à extraire du bruit de fond par l'utilisation directe de capteurs.

Dans cette problématique d'analyse de composés dans l'air, la conception du microsystème s'est basée sur la chromatographie en phase gazeuse (GC) qui figure parmi les techniques les plus sélectives et les plus sensibles. En effet, la caractérisation de composés volatils ou semi-volatils, dans des domaines tels que l'environnement, l'agro-alimentaire, la pharmacie, ou encore la pétrochimie, fait appel en premier lieu à la technique de chromatographie en phase gazeuse qui permet de doser et d'analyser un très large éventail de composés. Cette technique présente par ailleurs un fort potentiel de miniaturisation d'ores et déjà exploité avec les chromatographes portables et les chromatographes miniaturisés hybrides, beaucoup plus compacts. Ainsi, la microchromatographie en phase gazeuse ( $\mu$ GC), dans laquelle s'inscrit le présent projet, offre la perspective d'analyses rapides, portables, ne consommant que peu d'énergie, grâce à des effets d'échelle qui résultent de la miniaturisation des composants clés du système. En effet, les colonnes ayant un diamètre faible de l'ordre de la dizaine de  $\mu\text{m}$ , la  $\mu$ GC permet d'accroître la résolution de l'analyse et de réduire la longueur des dites colonnes. Les faibles volumes morts agissent de la même manière, améliorant ainsi la résolution et la sensibilité. Les volumes d'échantillon sont diminués. Le volume et le poids de l'instrument sont réduits. Par ailleurs, la production de tels micro-instruments en technologie du silicium permettra de réduire le coût de production. L'analyse de gaz pourrait alors se faire *in situ*. Les  $\mu$ GC sont des instruments souvent constitués d'une combinaison d'éléments microfabriqués, résultant de technologie silicium ou assimilées, avec également des éléments de petite taille, qui résultent de technologies plus conventionnelles. Trois micromodules ont donc été pensés pour la conception du microsystème: un module de préconcentration, un de séparation et enfin un de détection.

Ainsi, concernant le micromodule de préconcentration, un adsorbant permettant l'échantillonnage des composés C2 à C20 avait été envisagé. Or, Wilkins (2002) a montré que les molécules des groupes C2 à C4 émises par les moisissures sont également produites par de nombreux organismes vivants. De ce fait, en raison de leur manque de spécificité, ces molécules n'ont pas été retenues dans le cadre de notre étude. L'adsorbant solide (TENAX TA) a donc finalement été choisi. En effet, celui-ci limite le prélèvement à des composés organiques volatils de C4 à C20 présentant un point d'ébullition supérieur à 60°C. Par ailleurs, les composés très volatils et inorganiques ne sont ainsi pas retenus par cet adsorbant. Par conséquent, l'adsorbant choisi est le plus adapté puisqu'il permet le piégeage de la plupart des composés issus d'un développement fongique.

Les tubes Tenax de prélèvement classiquement utilisés pour la détection des COV dans cette étude contiennent un volume utile de 1 cm<sup>3</sup> avec des grains de diamètre moyen de 300  $\mu\text{m}$ . La taille des grains utilisée pour la microstructure (diamètre moyen de 120  $\mu\text{m}$ ) permet d'augmenter la surface spécifique. Par conséquent, malgré la diminution du volume utile (0,20 cm<sup>3</sup>), la surface active équivalente est conservée. Ainsi, l'efficacité de concentration

(rétention et volume de perçage) de cette microstructure reste équivalente à un tube de prélèvement classique.

Concernant le module de séparation, la longueur de la microcolonne (5 m) est plus courte que celle d'une colonne classique (50 m). Malgré cette diminution, une meilleure efficacité de rétention peut être obtenue avec des films épais de polydiméthylsiloxanes, permettant ainsi l'analyse de composés légers, tels que les traceurs sélectionnés. Les tests de séparation réalisés dans cette étude confirment que cette phase permet d'obtenir une séparation suffisante pour notre problématique, malgré la faible longueur de la colonne.

Les composés détectés appartenant essentiellement aux alcènes, cétones et esters et étant polaires, une phase stationnaire apolaire à base de PDMS a été choisie pour la microcolonne. Ainsi, différents temps de rétention ont été retrouvés pour les diverses familles, prouvant l'efficacité de la séparation de la microcolonne.

Cependant, il reste difficile de comparer ces résultats avec la littérature puisqu'aucune de ces études ne travaille sur les traceurs d'un développement fongique. Malgré tout, d'autres composés plus classiquement recherchés, tels que le benzène et le toluène, sont également présents dans des échantillons contaminés par des moisissures. Il a été ainsi possible de comparer les efficacités de rétention pour ces deux molécules avec d'autres études développant des microcolonnes PDMS. Ainsi, Serrano *et al.*, en 2009, à partir d'une microcolonne de 3 m, obtiennent une différence de rétention de 10 s (Serrano *et al.*, 2009). Reidy *et al.* en 2006, avec des colonnes de 0,5 à 3 m, obtiennent des temps compris entre 15 et 40 s selon la longueur de la colonne (Reidy *et al.*, 2006). Les variations de rétention obtenues dans nos essais sont du même ordre de grandeur puisque que ces deux composés sont désorbés, dans nos conditions d'essai, à 24 s d'intervalle.

En ce qui concerne le module de détection, il doit permettre, notamment par un paramétrage simple *in situ*, une modularité et une sélectivité vis-à-vis des COV présents. Les tests préliminaires réalisés à partir de capteurs polymères ont permis de discriminer en laboratoire, un environnement contaminé d'un environnement stérile (Joblin *et al.*, 2010b). Ces essais montrent qu'une détection de moisissures à partir de cette famille de capteurs est envisageable. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus dans diverses études discriminant en laboratoire différents environnements contaminés (Gibson *et al.*, 1997; Canhoto *et al.*, 2004; Dutta *et al.*, 2005; Hamilton *et al.*, 2006; Bailey *et al.*, 2008).

Cependant, dans ces études, la discrimination d'ambiances s'appuie sur la détection d'une empreinte globale ne distinguant pas la nature des COV. Or, Moularat *et al.* ont montré que la détection *in situ* d'un développement fongique par la mesure de COV implique le calcul d'un indice prenant en compte l'origine, la spécificité, et la présence / absence de chaque traceur fongique (Moularat *et al.*, 2008b; Moularat *et al.*, 2008c).

De plus, les systèmes multi-capteurs utilisés pour la discrimination d'ambiances nécessitent la définition d'un environnement de référence stable et s'appuient sur des échantillons avec un bruit de fond stable (COV émis par les supports, matériaux). Cette approche n'est donc pas adaptée à des prélèvements *in situ*.

Le choix des polymères conducteurs pour le module de détection a été guidé tout d'abord, par les propriétés cinétiques de ces derniers à température ambiante, par la grande variété de monomères et les multiples possibilités de substitutions permettant une grande diversification des capteurs. Contrairement à d'autres familles de capteurs chimiques, comme les oxydes métalliques, les polymères conducteurs permettent la détection de molécules polaires telles que les traceurs utilisés dans les indices de contamination fongique (Albert *et al.*, 2000).

Les polymères conducteurs permettent de passer outre les limites (modularité, spécificité aux composés polaires, consommation énergétique...) des oxydes métalliques ou des matériaux composites. Leurs compositions chimiques sont semblables à celles des COV, ce qui induit des interactions physiques entre le polymère et le COV. Par ailleurs, leurs structures sont modifiables, ce qui permet de créer des matériaux avec des sélectivités définies afin de cibler les COV. L'ensemble de ces caractéristiques rend pertinente l'utilisation de cette famille de capteurs vis-à-vis de la problématique de cette étude (traceurs polaires, facilité d'intégration, modularité...). Cependant, les mécanismes précis d'interactions restent méconnus et le paramètre de l'humidité est un facteur à prendre en considération au cours des études s'appuyant sur cette technologie pour la détection de COV dans des environnements réels.

En effet, les résultats ont montré que l'influence de la teneur en eau de l'échantillon reste un problème majeur pour l'application de ces capteurs à la détection fongique. Une compétition entre les fonctions OH de l'eau et des alcools semble se produire au niveau des sites d'adsorption des polymères. Cependant, la forte sensibilité à l'humidité des capteurs a été prise en compte par le choix de l'adsorbant en amont du module de détection. Ainsi, l'hydrophobicité du Tenax permet de réduire la rétention des molécules d'eau lors du prélèvement. De plus, au niveau du module de séparation, seules les molécules d'intérêt sont exposées aux capteurs. Par conséquent, la pollution des couches sensibles, notamment par l'eau, est limitée.

Par ailleurs, à l'heure actuelle, les capteurs polymères restent insuffisamment spécifiques pour permettre la détection de COV individuellement. De surcroît, les concentrations microbiennes utilisées dans les études précédentes, ne sont pas représentatives des concentrations rencontrées dans les environnements réels favorisant ainsi la réaction des capteurs. Dans ce contexte, un travail de thèse est engagé depuis 2009 sur l'étude et la compréhension des mécanismes d'adsorption des Composés Organiques Volatils par les couches polymères. Différentes solutions sont donc envisagées concernant les aspects optimisation du module de détection. D'une part, une étude approfondie concernant l'influence de la géométrie des électrodes et de la morphologie des films polymères sur la réactivité des capteurs doit permettre l'obtention d'un temps de réponse adapté. En effet, Hamilton *et al.* (2005) ainsi que Li *et al.* (2007) montrent que la sensibilité et la sélectivité des films polymères dépendent de leurs morphologies (Hamilton *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2007a). D'autre part, un travail sur les chaînes (fonctionnalités) des polymères conducteurs reste donc nécessaire afin d'optimiser leurs sensibilités et leurs sélectivités à différents composés cibles (Li *et al.*, 2007a; Bailey *et al.*, 2008).

Suite aux développements des trois modules principaux, des cartes de commandes ont été réalisées afin de contrôler les différents éléments composant le système. Afin de réaliser les différentes étapes nécessaires à l'analyse des composés d'un échantillon d'air, l'interface utilisateur développée sous Labview permet la gestion et le contrôle de l'état du système durant l'analyse. La modularité de cet environnement de programmation graphique, bien que trop complexe pour un système intégré, permet ici la multiplication des essais et ainsi le paramétrage de ce prototype.

Les mesures de débit à différents points de la chaîne ainsi que la caractérisation des rampes de températures permettent de placer les modules dans les conditions de validations utilisées lors de leurs caractérisations. Si les limites du module de détection (temps de réponse et méthode de mesure des variations des couches sensibles) ne permettent pas, pour le moment, son utilisation en sortie du système, en revanche, la validation de chacun des modules et la caractérisation des paramètres de fonctionnement (débit, température...) démontre la faisabilité d'un tel système.

## CONCLUSION GENERALE

L'objectif de ce travail de recherche était d'élaborer un microsystème d'analyse de l'air destiné à la détection rapide d'un développement fongique dans les espaces clos en s'appuyant sur une méthode de détection, développée au CSTB, basée sur l'identification de traceurs chimiques.

La surveillance d'environnements intérieurs et la caractérisation de la source de contamination nécessitent la mise en œuvre d'un système permettant une détection rapide (de l'ordre de l'heure) et sensible aux traceurs d'un développement fongique présents en faibles concentrations (de l'ordre du ppm). Son utilisation sur site sous entend également que ce dispositif soit compact et portable. La réponse à ces différents objectifs a conduit à organiser ce projet en deux étapes.

**La première étape** a abouti à une nouvelle bibliothèque de 15 composés issus du métabolisme fongique qui a été implémentée à la base de données des émissions fongiques développée au CSTB. Cette nouvelle base de données permet ainsi d'obtenir une liste de 29 traceurs chimiques d'une contamination fongique adaptée à un plus grand nombre d'environnements intérieurs. L'indice de contamination fongique breveté en 2007 par le CSTB a ainsi pu être consolidé par l'ajout de ces 15 nouveaux traceurs, parmi lesquels des cibles spécifiques de supports contaminés. Cette dernière approche a été menée dans l'optique d'identifier la source de contamination.

Deux indices spécifiques ont par ailleurs été développés afin de répondre, d'une part à la problématique d'une contamination par *F. solani* dans les grottes de Lascaux (indice « Lascaux »), et d'autre part à une contamination par les basidiomycètes sur le bois (Indice « Phellinus »).

La validation sur sites de ces 2 nouveaux indices et de l'« ICF », a montré la nécessité de développer un système modulable en termes de COV à détecter.

Dans le cadre du développement de ces indices de contamination spécifiques, la diversité des environnements intérieurs en termes de compositions chimiques et de volumes a également conduit à une caractérisation de la diffusion des COV fongiques afin de définir une stratégie d'échantillonnage pour le système. Ainsi, pour l'ensemble d'une pièce à analyser, un unique point de prélèvement est suffisant.

**La seconde étape** a consisté en l'élaboration d'un microsystème de détection des contaminations fongiques, réalisée en 3 temps :

- Elaboration des modules de traitement de l'échantillon (préconcentration et séparation).
- Elaboration d'un module de détection des composés cibles par des capteurs chimiques.
- Intégration et pilotage du système.

Un procédé de fabrication basé sur les technologies MEMS a été défini, afin de réaliser deux microstructures inspirées des chaînes d'analyses classiques de chromatographie en phase gazeuse. Des procédés de fonctionnalisation ont également été définis pour chacune des deux structures.

Les essais de caractérisation des deux microstructures de traitement de l'échantillon ont permis la rétention et la séparation de composés cibles à partir de prélèvements d'air. Ainsi, la rétention et la séparation de 11 traceurs fongiques testés en laboratoire ont été validées.

Concernant le module de détection, des essais de caractérisation de couches sensibles à partir d'un système multicapteurs composés de polymères conducteurs ont permis d'identifier des polymères permettant la distinction entre un environnement stérile et un environnement contaminé par un développement fongique. Ces polymères conducteurs ont ainsi été implémentés dans le module de détection en sortie du système avec le développement de paires d'électrodes et d'une chambre de confinement. Ces essais ont également permis de montrer que la réponse de ces capteurs était répétable et réversible.

Suite à ces résultats expérimentaux, l'étape d'intégration et de pilotage du système de ce travail de recherche s'est focalisée sur la possibilité de réaliser un dispositif permettant la détection sélective des composés définis lors de la phase de développement des indices.

Une architecture de système, basée sur les modules développés précédemment, a alors été conçue. Afin de pouvoir réaliser ces différentes étapes d'analyse, le système se compose d'éléments permettant une circulation d'air interne et d'éléments permettant un contrôle de la température des microstructures de concentration et de séparation.

Afin de contrôler les différents éléments du système, une carte de commande a également été réalisée.

Les mesures directes des variations de résistivité réalisées à partir des différents dépôts de polymères ont mis en évidence un temps de réponse des capteurs relativement long. Cette constatation limite pour le moment l'utilisation du module de détection en tant que détecteur chromatographique en sortie du système.

Différents phénomènes permettent d'expliquer le manque de réactivité des capteurs, ainsi les tailles des dépôts et des électrodes de contact doivent être modifiées afin de diminuer la valeur de la résistance nominale et faciliter les interactions entre le polymère et le COV. De plus, un travail de thèse est engagé depuis 2009 sur l'étude et la compréhension des mécanismes d'adsorption des Composés Organiques Volatils par des couches polymères. Ce travail rentre dans le cadre de la continuité de cette thèse sur l'aspect optimisation du module de détection avec une application au développement de microcapteurs pour la détection de développement fongique dans les environnements intérieurs.

Le couplage entre les différents éléments du système a permis d'accéder à des résultats expérimentaux importants puisque des mesures de composés cibles traversant la colonne ont pu être réalisées lors d'essais impliquant une source continue de traceurs (prélèvement dans une chambre contenant des traceurs). Ces résultats, couplés aux essais réalisés sur les modules de prétraitement à partir de chambres contaminées, constituent une avancée technologique importante. En effet, jusqu'à présent, le développement de microcapteurs gaz était entravé par leur manque de sélectivité notamment pour des applications en atmosphère réelle. L'utilisation des modules de prétraitement en amont des capteurs chimiques permet d'envisager un dispositif de détection modulable et sélectif pour divers composés, dont les traceurs fongiques impliqués dans les indices de contamination.

De plus, les temps de rétention des molécules observés dans cette étude avec l'utilisation de la microcolonne montrent que cette méthode de détection permet d'envisager une mesure rapide de composés cibles dans un cadre de surveillance continue d'environnements intérieurs. Par ailleurs, les modules principaux composant le système étant réalisés à partir de procédés de fabrication relativement classiques et plutôt bien maîtrisés, l'industrialisation d'un microsystème basé sur ces éléments est envisageable. En effet, le développement des supports pour les capteurs polymères conducteurs pouvant être réalisé à partir des techniques relevant des microtechnologies, le développement de chacun des modules peut être envisagé sur un même support.

Ce projet s'inscrit ainsi dans le cadre des études visant la miniaturisation des systèmes d'analyses chimiques, notamment la notion de « laboratoire sur puce » (Lab-on-a-chip), avec un système de chromatographie intégré pour le développement de système portable comprenant une ou plusieurs fonctions d'un système d'analyse classique de laboratoire.

Le système proposé permet de mettre en place une stratégie de surveillance avec un pas de temps faible entre les mesures. Ainsi, d'une part, une procédure d'alerte peut être enclenchée pour rechercher et traiter une contamination. D'autre part, les systèmes de contrôle de l'environnement (ventilation, température, humidité) peuvent être asservis au système de détection pour empêcher une contamination. Ces deux stratégies sont ici rendues envisageables par la possibilité de mesures en continu.

L'originalité de la technique proposée dans ce travail repose sur le couplage entre un module de concentration (pour la détection de composés émis en faible quantité), un module de séparation (avec un temps de rétention défini pour chaque molécule cible) et la réponse d'une matrice de capteurs permettant d'obtenir une identification des molécules recherchées avec le couplage de l'information du temps de rétention. Ce travail de thèse confirme donc que le développement d'un système miniaturisé composé de capteurs chimiques est envisageable par couplage de différents modules pour la détection de composés cibles dans un environnement intérieur. L'ensemble de ces travaux a ainsi conduit au dépôt d'un brevet d'invention sur un procédé de détection de développement fongique dans les environnements intérieurs. Aujourd'hui, ces travaux se poursuivent dans le cadre d'un post-doctorat visant l'amélioration du traitement du signal, l'intégration, et la miniaturisation de ce prototype.





## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

**Abadal, G., Davis, Z. J., Helbo, B., Borrisé, X., Ruiz, R., Boisen, A., Campabadal, F., Esteve, J., Figueras, E., Pérez-Murano, F. et Barniol, N. (2001)**

Electromechanical model of a resonating nano-cantilever-based sensor for high-resolution and high-sensitivity mass detection.

*Nanotechnology*, **12**, 100-104.

**Abramson, D., Hulasare, R., York, R. K., White, N. D. G. et Jayas, D. S. (2005)**

Mycotoxins, ergosterol, and odor volatiles in durum wheat during granary storage at 16% and 20% moisture content.

*Journal of Stored Products Research*, **41** (1), 67-76.

**ACGIH (1999)**

Bioaerosols: assessment and control.

*In: American Conference of Industrial Hygienists, Cincinnati.*

**Adams, J. D., Parrott, G., Bauer, C., Sant, T., Manning, L., Jones, M., Rogers, B., McCorkle, D. et Ferrell, T. L. (2003)**

Nanowatt chemical vapor detection with a self-sensing piezoelectric microcantilever array.

*Applied physics letters*, **83** (16), 3428-3430.

**Adan, O., Samson, R. et Wijnen, J. (1994)**

Fungal resistance tests of gypsum based interior finishes under steady-state air humidities.

*In: Health implication of fungi in indoor environments*, Samson, R. A., Flannigan, B., Flannigan, M. E., Verhoeff, A. P., Adan, O. C. G. et Hoekstra, E. S., **2**, p. 451-484.

**Agah, M., Lambertus, G. R., Sacks, R. D. et Wise, K. D. (2006)**

High-speed MEMS-based gas chromatography.

*Journal of microelectromechanical systems*, **15** (5), 1371-1378.

**Agah, M., Potkay, J. A., Driscoll, J., Sacks, R. D., Kaviany, M. et Wise, K. D. (2003)**

Thermal behavior of high-performance temperature programmed microfabricated gas chromatography columns.

*In: Transducers '03, The 12th International Conference on Solid State Sensors, Actuators and Microsystems*, Boston, **3E43.P**, 1339-1342.

**Agah, M., Potkay, J. A., Lambertus, G. R., Sacks, R. D. et Wise, K. D. (2005)**

High-performance temperature-programmed microfabricated gas chromatography columns.

*Journal of microelectromechanical systems*, **14** (5), 1039-1050.

**Agah, M. et Wise, K. D. (2005)**

A fully-dry PECVD-oxynitride process for microGC column fabrication.

*In: MEMS 2005, 18th IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems*, Miami, 774-777.

**Agrawal, O., Dhawan, K., Garg, F., Shaheen, N., Pathak et Misra, A. (1988)**

Study of Biodeterioration of the Ajanta Wall Paintings.

*International Biodeterioration and Biodegradation*, **24**, 121-129.

**Aisner, J., Schimpff, S. C., Bennett, J. E., Young, V. M. et Wiernik, P. H. (1976)**

*Aspergillus* infections in cancer patients, association with fireproofing materials in a new hospital.

*The Journal of the American Medical Association*, **235** (4), 411-412.

**Albert, K. J., Lewis, N. S., Schauer, C. L., Sotzing, G. A., Stitzel, S. E., Vaid, T. P. et Walt, D. R. (2000)**

Cross-reactive chemical sensor arrays.

*chemical Reviews*, **100**, 2595-2626.

**Alfeeli, B., Cho, D., Ashraf-Khorassani, M., Taylor, L. T. et Agah, M. (2008)**

MEMS-Based Multi-Inlet/Outlet Preconcentrator Coated by Inkjet Printing of Polymer Adsorbents.

*Sensors and Actuators B: Chemical*, **In Press, Accepted Manuscript**.

- Alvarez, A. J., Buttner, M. P. et Stetzenbach, L. D. (1995)**  
 PCR for bioaerosol monitoring: sensitivity and environmental interference.  
*Applied and Environmental Microbiology*, **61** (10), 3639-3644.
- Alvarez, L., Gil, A., Ezpeleta, O., Garcia-Jalon, J. et Lopez de certain, A. (2004)**  
 Immunotoxic effects of Ochratoxin A in wistar rats after oral administration.  
*Food and Chemical Toxicology*, **42**, 825-834.
- An, H. R., Mainelis, G. et White, L. (2006)**  
 Development and calibration of real-time PCR for quantification of airborne microorganisms in air samples.  
*Atmospheric Environment*, **40** (40), 7924-7939.
- Angelescu, D. E., Harrison, C., Van Hal, R., Wong, J., Donzier, E., Vancauwenberghe, O., Goodwin, A. R. H., Manrique, M. et Tai, Y.-C. (2007)**  
 A small world with great promise.  
*Oilfield Review*, 60-68.
- Arnow, P. M., Anderssen, R. L., Mainous, P. D. et Smith, E. J. (1978)**  
 Pulmonary Aspergillosis during hospital renovation.  
*American Review of Respiratory Disease*, **118**, 49-53.
- Arshak, K., Adley, C., Moore, E., Cunniffe, C., Campion, M. et Harris, J. (2007)**  
 Characterisation of polymer nanocomposite sensors for quantification of bacterial cultures.  
*Sensors and Actuators B: Chemical*, **126** (1), 226-231.
- Aubert, P.-H., Beouch, L., Tran-Van, F., Stephan, O. et Chevrot, C. (2006)**  
 Copolymers based on fluorene dyads mixed to 3,4-ethylenedioxythiophene units: Optical properties of random versus regular structures.  
*Synthetic Metals*, **156** (14-15), 898-906.
- Axelson, B.-O., Saraf, A. et Larsson, L. (1995)**  
 Determination of ergosterol in organic dust by gas chromatography-mass spectrometry.  
*Journal of Chromatography B*, (1), 77-84.
- Ayerst, G. (1966)**  
 Influence of physical factors on deterioration by moulds.  
*Society of Chemical Industry Monograph*, **23**, 14-20.
- Bae, B., Yeom, J., Radadia, A. D., Masel, R. I. et Shannon, M. A. (2007)**  
 A fully-integrated mems preconcentrator for rapid gas sampling.  
*In: The 14th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems*, Lyon, France, **2**, 1497-1500.
- Bai, H. et Shi, G. (2007)**  
 Gas sensors based on conducting polymers.  
*Sensors*, **7**, 267-307.
- Bailey, A. L. P. S., Pisanelli, A. M. et Persaud, K. C. (2008)**  
 Development of conducting polymer sensor arrays for wound monitoring.  
*Sensors and Actuators B: Chemical*, **131** (1), 5-9.
- Balasubramanian, S., Panigrahi, S., Kottapalli, B. et Wolf-Hall, C. E. (2007)**  
 Evaluation of an artificial olfactory system for grain quality discrimination.  
*LWT - Food Science and Technology*, **40** (10), 1815-1825.
- Baller, M. K., Lang, H. P., Fritz, J., Gerber, C., Gimzewski, J. K., Drechsler, U., Rothuizen, H., Despont, M., Vettiger, P., Battiston, F. M., Ramseyer, J. P., Fornaro, P., Meyer, E. et Güntherodt, H. J. (2000)**  
 A cantilever array-based artificial nose.  
*Ultramicroscopy*, **82** (1-4), 1-9.

**Bariain, C., Matias, I. R., Fdez-Valdivielso, C., Elosua, C., Luquin, A., Garrido, J. et Laguna, M. (2005)**  
Optical fibre sensors based on vapochromic gold complexes for environmental applications.  
*Sensors and Actuators B: Chemical*, **108** (1-2), 535-541.

**Bariain, C., Matias, I. R., Romeo, I., Garrido, J. et Laguna, M. (2001)**  
Behavioral experimental studies of a novel vapochromic material towards development of optical fiber organic compounds sensor.  
*Sensors and Actuators B: Chemical*, **76** (1-3), 25-31.

**Bartlett, P. N. et Gardner, J. W. (1992)**  
Odour sensors for an electronic nose.  
*In: Sensors and sensory systems for an electronic nose*, Gardner, J. W. et Bartlett, P. N., Nato asi, **Serie E vol.212**, p. 31-51.

**Bassi, M. et Giacobini, C. (2001)**  
Scanning electron microscopy: a new technique in the study of the microbiology of works of art.  
*International Biodeterioration and Biodegradation*, **48**, 55-66.

**Battiston, F. M., Ramseyer, J. P., Lang, H. P., Baller, M. K., Gerber, C., Gimzewski, J. K., Meyer, E. et Güntherodt, H. J. (2001)**  
A chemical sensor based on a microfabricated cantilever array with simultaneous resonance-frequency and bending readout.  
*Sensors and Actuators B: Chemical*, **77** (1-2), 122-131.

**Beeby, S. (2004)**  
Materials and fabrication techniques.  
*In: MEMS Mechanical sensors*, p. 1-36.

**Beguín, H. et Nolard, N. (1994)**  
Mould biodiversity in homes. I. Air and surface analysis of 130 dwellings.  
*Aerobiologia*, **10**, 157-166.

**Bellanger, A. P., Reboux, G., Roussel, S., Grenouillet, F., Didier-Scherer, E., Dalphin, J. C. et Millon, L. (2009)**  
Indoor fungal contamination of moisture-damaged and allergic patient housing analysed using real-time PCR.  
*Letters in Applied Microbiology*, **49** (2), 260-266.

**Bender, F., Barie, N., Romoudis, G., Voigt, A. et Rapp, M. (2003)**  
Development of a preconcentration unit for a SAW sensor micro array and its use for indoor air quality monitoring.  
*Sensors and Actuators B: Chemical*, **93** (1-3), 135-141.

**Bergaud, C. et Nicu, L. (2000)**  
Viscosity measurements based on experimental investigations of composite cantilever beam eigenfrequencies in viscous media.  
*Review of scientific instruments*, **71**, 2487-2491.

**Bertinchamps, F., Demoulin, O. et Dupont, J. (2000)**  
Approche de la problématique des mycotoxines: Partie méthodologie analytique.  
*Université Catholique de Louvain*, pp.62.

**Bertinchamps, F., Demoulin, O. et Dupont, J. (2000)**  
Approche de la problématique des mycotoxines: Partie méthodologie analytique.  
*Université Catholique de Louvain*, pp.62.

**Bex, V. et Squinazi, F. (2006)**  
Mise en évidence de moisissures des ambiances intérieures par la mesure des (1->3)-[beta]-D-glucanes.  
*Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique*, **46** (3), 184-187.

**Bjurman, J. (1999)**

Release of MVOCs from microorganisms.

*In: Organic Indoor Air Pollutants*, SALTHAMMER, T., WILEY-VCH, p. 259-273.

**Blumenthal, C. Z. (2004)**

Production of toxic metabolites in *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei*: justification of mycotoxin testing in food grade enzyme preparations derived from the three fungi.

*Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **39**, 214-228.

**Boisen, A., Thaysen, J., Jensenius, H. et Hansen, O. (2000)**

Environmental sensors based on micromachined cantilevers with integrated read-out.

*Ultramicroscopy*, **82** (1-4), 11-16.

**Boissier, M. (2003)**

Etude et compréhension des phénomènes environnementaux régissant la colonisation des produits de construction par les aérosols fongiques: application à l'hygiène des environnements intérieurs.

*PhD Thesis*, Paris XII University

**Börjesson, T., Stöllman, U. et Schnürer, J. (1990)**

Volatile metabolites and other indicators of *Penicillium aurantiogriseum* growth on different substrates.

*Applied and Environmental Microbiology*, **56** (12), 3705-3710.

**Bouscaren, P. (1998)**

Nature et sources de COV.

*In: Les composés organiques volatils (COV) dans l'environnement*, LE CLOIREC, P., Ecole des mines de Nantes, Paris, p. 59-85.

**Bousta, F. (1998)**

Amélioration de la rétention par le bois des sels d'ammonium quaternaire et conséquences sur la résistance à l'attaque des champignons. Etude du comportement, face aux basidiomycètes, du bois greffé par des motifs acyles à longue chaîne carbonée.

*PhD Thesis*, Nancy 1 University

**Bouvree, A., Feller, J.-F., Castro, M., Grohens, Y. et Rinaudo, M. (2009)**

Conductive Polymer nano-bioComposites (CPC): Chitosan-carbon nanoparticle a good candidate to design polar vapour sensors.

*Sensors and Actuators B: Chemical*, **138** (1), 138-147.

**Bruschi, P., Cacialli, F., Nannini, A. et Neri, B. (1994)**

Gas and vapour effects on the resistance fluctuation spectra of conducting polymer thin-film resistors.

*Sensors and Actuators B: Chemical*, **19** (1-3), 421-425.

**Buttner, M., Willeke, K. et Grinshpun, S. (1997)**

Sampling and analysis of airborne microorganisms.

*In: Manual of Environmental Microbiology*, Washington, D.C, p. 137-140.

**Cabot, A., Arbiol, J., Cornet, A., Morante, J. R., Chen, F. et Liu, M. (2003)**

Mesoporous catalytic filters for semiconductor gas sensors.

*Thin Solid Films*, **436** (1), 64-69.

**Cahagnier, B. (1998)**

*In* Moisissures des aliments peu hydratés.

*Collection sciences et techniques agroalimentaires*, Lavoisier Tec et Doc, Paris.

**Cai, Q.-Y. et Zellers, E. T. (2002)**

Dual-chemiresistor GC detector employing monolayer-protected metal nanocluster interfaces.

*Analytical chemistry*, **74** (14), 3533-3539.

**Canhoto, O. et Magan, N. (2005)**

Electronic nose technology for the detection of microbial and chemical contamination of potable water.  
*Sensors and Actuators B: Chemical*, **106** (1), 3-6.

**Canhoto, O., Pinzari, F., Fanelli, C. et Magan, N. (2004)**

Application of electronic nose technology for the detection of fungal contamination in library paper.  
*International Biodeterioration & Biodegradation*, **54** (4), 303-309.

**Carlile, M. J. et Watkinson, S. C. (1994)**

In *The fungi*. Academic Press, Londres.

**Charlot, B. (2002)**

Les technologies de fabrication des microsystèmes.

In: *Conception des microsystèmes sur silicium*, Mir, S., Hermes Science Publications, Paris, p. 69-100.

**Chasseur, C. et Nolard, N. (2003)**

Les champignons dans l'habitat.

*CSTC magazine*, **1**, 3-15.

**Chew, G. L., Douwes, J., Doekes, G., Higgins, K. M., Strien, R. v., Spithoven, J. et Brunekreef, B. (2001)**

Fungal extracellular polysaccharides, b(1-3)-glucans and culturable fungi in repeated sampling of house dust.

*Indoor Air*, **11**, 171-178.

**Clarke, J. A., Johnstone, C. M., Kelly, N. J., Mc Lean, R. C., Anderson, J. A., Rowan, N. J. et Smith, J. E. (1999)**

A technique for the prediction of the conditions leading to mould growth in buildings.

*Building and Environment*, **34**, 515-521.

**Corcoran, P., Shurmer, H. V. et Gardner, J. W. (1993)**

Integrated tin oxide sensors of low power consumption for use in gas and odour sensing.

*Sensors and Actuators B: Chemical*, **15** (1-3), 32-37.

**Cornet, M., Fleury, L., Maslo, C., Bernard, J. et Brucker, G. (2002)**

Epidemiology of invasive aspergillosis in France: a six-year multicentric survey in the Greater Paris area".

*Journal of Hospital Infection*, **51** (4), 288-296.

**Courjon, D. et Bainier, C. (2001)**

Attaque chimique.

In: *Le champs proche optique*, Springer, p. 161-168.

**D'Amico, A., Di Natale, C. et Verona, E. (1997)**

Acoustic devices.

In: *Handbook of Biosensors and Electronic Noses - Medecine, Food, and the Environment*, Kress-Rogers, E., CRC, p. 197-223.

**Datskos, P. G. et Sauers, I. (1999)**

Detection of 2-mercaptoethanol using gold-coated micromachined cantilevers.

*Sensors and Actuators B: Chemical*, **61** (1), 75-82.

**Davies, R., Summerbell, R., Haldane, D., Dufour, A., Yu, K., Broder, I., Dales, R., Kirkbride, J., Kauri, T. et Robertson, W. (1995)**

Contamination fongique dans les immeubles publics. Guide facilitant la détermination et la gestion des problèmes.

*Comité fédéral-provincial de l'hygiène du milieu et du travail, Santé Canada*, K1A 0L2, pp.90.

**Davis, Z. J., Abadal, G., Kuhn, O., Hansen, O., Grey, F. et Boisen, A. (2000)**

Fabrication and characterization of nanoresonating devices for mass detection.

*Journal of Vacuum Science and Technology B*, **18** (2), 612-616.

**de Mello, A. (2002)**

On-chip chromatography: the last twenty years.  
*Lab on a chip*, **2**, 48N-54N.

**Dillon, H. K., Miller, J. D., Sorenson, W. G., Douwes, J. et Jacobs, R. R. (1999)**

Review of methods applicable to the assessment of mold exposure to children.  
*Environmental Health Perspectives*, **107** (3), 473-480.

**Donald, W. W. et Mirosha, C. J. (1977)**

Chitin as a measure of fungal growth in stored corn and soybean seed.  
*Cereal Chemistry*, **54** (3), 466-474.

**Douwes, J., Doekes, G., Montijin, R., Heederik, D. et Brunekreef, B. (1996)**

Mesurement of  $\beta(1\rightarrow3)$ -glucans in occupational and home environments with an inhibition enzyme immunoassay.  
*Applied and Environmental Microbiology*, **62** (9), 3176-3182.

**Douwes, J., Zuihof, A., Doekes, G., Van der Zee, S., Wouters, I., Boezen, H. et Brunekreef, B. (2000)**

(1 $\rightarrow$ 3)-beta-D glucan and endotoxins in house dust and peak flow variability in children.  
*American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, **162**, 1348-1354.

**Dutta, R., Morgan, D., Baker, N., Gardner, J. W. et Hines, E. L. (2005)**

Identification of *Staphylococcus aureus* infections in hospital environment: electronic nose based approach.  
*Sensors and Actuators B: Chemical*, **109** (2), 355-362.

**Eduard, W. et Heederik, D. (1998)**

Methods for quantitative assessment of airborne levels of noninfectious microorganisms in highly contaminated work environments.  
*American Industrial Hygiene Association Journal*, **59**, 113-127.

**Engelhart, S., Looock, A., Skutlarek, D., Sagunski, H., Lommel, A., Färber, H. et Exner, M. (2002)**

Occurrence of toxigenic *Aspergillus versicolor* isolates and Sterigmatocystin in carpet dust from damp indoor environments.  
*Applied and Environmental Microbiology*, **68** (8), 3886-3890.

**Ezeonu, I. M., Price, D. L., Simmons, R. B., Crow, S. A. et Ahearn, D. G. (1994)**

Fungal production of volatiles during growth on fiberglass.  
*Applied and Environmental Microbiology*, **60** (11), 4172-4173.

**Falascioni, M., Gobbi, E., Pardo, M., Della Torre, M., Bresciani, A. et Sberveglieri, G. (2005)**

Detection of toxigenic strains of *Fusarium verticillioides* in corn by electronic olfactory system.  
*Sensors and Actuators B: Chemical*, **108** (1-2), 250-257.

**Falate, R., Kamikawachi, R. C., Müller, M., Kalinowski, H. J. et Fabris, J. L. (2005)**

Fiber optic sensors for hydrocarbon detection.  
*Sensors and Actuators B: Chemical*, **105** (2), 430-436.

**Fallschissel, K., Kampfer, P. et Jackel, U. (2009)**

Direct detection of salmonella cells in the air of livestock stables by real-time PCR.  
*Annals of Occupational Hygiene*, **53** (8), 859-868.

**Fedoruk, M., Uhlman, S., Baker, D. et Yang, H. (2001)**

Analysis of microbial contamination of a ventilation system detected by measurement of microbial volatile organic compounds.  
*In: Bioaerosols, fungi and mycotoxins: health effects, assessment, prevention and control*, Johanning, E., New York, p. 386-395.

**Fernández-Sánchez, J. F., Segura Carretero, A., Cruces-Blanco, C. et Fernández-Gutiérrez, A. (2004)**

Highly sensitive and selective fluorescence optosensor to detect and quantify benzo[a]pyrene in water samples.  
*Analytica Chimica Acta*, **506** (1), 1-7.

**Fernandez, M. J., Fontecha, J. L., Sayago, I., Aleixandre, M., Lozano, J., Gutierrez, J., Gracia, I., Cane, C. et Horrillo, M. d. C. (2007)**

Discrimination of volatile compounds through an electronic nose based on ZnO SAW sensors.  
*Sensors and Actuators B: Chemical*, **127** (1), 277-283.

**Fiedler, K., Schütz, E. et Geh, S. (2001)**

Detection of microbial volatile organic compounds (MVOCs) produced by moulds on various materials.  
*International Journal of Hygiene and Environmental Health*, **204** (2-3), 111-121.

**Filippov, A. P., Strizhak, P. E. et Il'in, V. G. (2007)**

Quartz crystal microbalance modified with Cu(II) stearate and octadecylamine co-ordination chemical compounds for detection of volatile organic compounds.  
*Sensors and Actuators B: Chemical*, **126** (2), 375-381.

**Fisher, G., Schwalbe, R., Möller, M., Ostrowski, R. et Dott, W. (1999)**

Species-specific production of microbial volatile organic compounds (MVOC) by airborne fungi from a compost facility.  
*Chemosphere*, **39** (5), 795-810.

**Flannigan, B. (1996)**

Air sampling for fungi in indoor environments.  
*Journal of Aerosol Science*, **28** (3), 381-392.

**Frayssinet, C. (1998)**

Les mycotoxines.  
*In: Moisissures des aliments peu hydratés*, Cahagnier, B., Paris, p. 157-183.

**Frye-Mason, G. C., Kottenstette, R. J., Lewis, P. R., Heller, E., Manginell, R. P., Adkins, D. R., Dulleck, G., Martinez, D., Sasaki, D., Mowry, C., Matzke, C. et Anderson, L. (2000)**

Hand-held miniature chemical analysis system ( $\mu$ Chemlab) for detection of trace concentrations of gas phase analytes.  
*In: Proceedings of the Micro-TAS '00 Workshop*, Enschede, The Netherlands.

**Fu, Y. Q., Colli, A., Fasoli, A., Luo, J. K., Flewitt, A. J., Ferrari, A. C. et Milne, W. I. (2009)**

Deep reactive ion etching as a tool for nanostructure fabrication.  
*Journal of Vacuum Science and Technology B*, **27** (3), 1520-1526.

**Fung, F. et Hughson, W. G. (2002)**

Health effects of indoor fungal bioaerosol exposure.  
*In: 9th International Conference on Indoor Air Quality and Climate*, Monterey, California, 46-51.

**Gardner, J. W. et Bartlett, P. N. (1994)**

A brief history of electronic noses.  
*Sensors and Actuators B: Chemical*, **18-19**, 211-220.

**Gardner, J. W. et Bartlett, P. N. (2000a)**

Data processing techniques.  
*In: Electronic Noses: Principles and Applications*, Oxford, New york, p. 140-180.

**Gardner, J. W. et Bartlett, P. N. (2000b)**

Introduction.  
*In: Electronic Noses: Principles and Applications*, Oxford, New york, p. 1-5.

**Garg, K. L., Jain, K. K. et Mishra, A. K. (1995)**

Role of fungi in the deterioration of wall paintings.  
*the Science of the Total Environment*, **167**, 255-271.



**Gargani, G. (1968)**

Fungus contamination of Florence art master pieces before and after the 1966 disaster.  
*Biodeterioration of Materials*, 252-257.

**Gibson, T. D., Prosser, O., Hulbert, J. N., Marshall, R. W., Corcoran, P., Lowery, P., Ruck-Keene, E. A. et Heron, S. (1997)**

Detection and simultaneous identification of microorganisms from headspace samples using an electronic nose.  
*Sensors and Actuators B: Chemical*, **44** (1-3), 413-422.

**Godish, T. (1995)**

*In Sick Buildings: Definition, Diagnosis and Mitigation.*  
Lewis Publishers, London.

**Golay, M. J. E. (1958)**

Theory of chromatography in open and coated tubular columns with round and rectangular cross-sections.  
*Gas chromatography*, **2**, 36-55.

**Gomez-Alarcon, G. et Angeles de la Torre, M. (1994)**

The effect of filamentous fungi on stone monuments: the Spanish experience.  
*In: Building Mycology*, Singh, J., E and FN SPON, p. 295-309.

**Göpel, W. (1998)**

Chemical imaging: I. Concepts and visions for electronic and bioelectronic noses.  
*Sensors and Actuators B: Chemical*, **52** (1-2), 125-142.

**Göpel, W. et Schierbaum, K.-D. (1991a)**

Definitions and typical examples.  
*In: Sensors - A Comprehensive Survey*, Göpel, W., Hesse, J. et Zemel, J. N., VCH, **Volume 2: chemical and Biochemical sensors Part I**, p. 1-29.

**Göpel, W. et Schierbaum, K.-D. (1991b)**

Electronic conductance and capacitance-sensors.  
*In: Sensors - A Comprehensive Survey*, Göpel, W., Hesse, J. et Zemel, J. N., VCH, **Volume 2: chemical and Biochemical sensors Part I**, p. 429-467.

**Göpel, W., Schierbaum, K.-D., Vaihinger, S. et Weimar, U. (1992)**

Fine-tuning of electron- and ion-conducting materials for sensor arrays.  
*In: Sensors and sensory systems for an electronic nose*, Gardner, J. W. et Bartlett, P. N., Nato asi, **Serie E vol.212**, p. 77-102.

**Gorny, R. L., Reponen, T., Willeke, K., Schechel, D., Robine, E., Boissier, M. et Grinshpun, S. A. (2002)**

Fungal fragments as indoor air biocontaminants.  
*Applied and Environmental Microbiology*, **68** (7), 3522-3531.

**Gracia, I., Ivanov, P., Blanco, F., Sabate, N., Vilanova, X., Correig, X., Fonseca, L., Figueras, E., Santander, J. et Cane, C. (2008)**

Sub-ppm gas sensor detection via spiral [mu]-preconcentrator.  
*Sensors and Actuators B: Chemical*, **In Press, Accepted Manuscript**.

**Grate, J. W., Abraham, M. H. et McGill, R. A. (1997)**

Sorbent polymer materials for chemical sensors and arrays.  
*In: Handbook of Biosensors and Electronic Noses - Medicine, Food, and the Environment*, Kress-Rogers, E., CRC, p. 593-612.

**Gravesen, S., Frisvad, J. et Samson, R. (1994)**

*In Microfungi.*  
Munksgaard Press, Copenhagen.

**Griffiths, W. et Decosemo, G. (1994)**

The assessment of bioaerosols: a critical review.  
*Journal of Aerosol Science*, **25** (8), 1425-1458.

**Groves, W. A., Zellers, E. T. et Frye, G. C. (1998)**

Analyzing organic vapors in exhaled breath using a surface acoustic wave sensor array with preconcentration: Selection and characterization of the preconcentrator adsorbent.  
*Analytica Chimica Acta*, **371** (2-3), 131-143.

**Hagleitner, C., Hierlemann, A., Lange, D., Kummer, A., Kerness, N., Brand, O. et Baltes, H. (2001)**

Smart single-chip gas sensor microsystem.  
*Nature*, **414**, 293-296.

**Halewyn, M.-A., Leclerc, J.-M., King, N., Belanger, M., Legris, M. et Frenette, Y. (2003)**

Les risques à la santé associés à la présence de moisissures en milieu intérieur.  
*Institut national de santé publique du Québec*, INSPQ-2002-027, pp.166 p.

**Hamilton, S., Hepher, M. J. et Sommerville, J. (2005)**

Polypyrrole materials for detection and discrimination of volatile organic compounds.  
*Sensors and Actuators B: Chemical*, **107** (1), 424-432.

**Hamilton, S., Hepher, M. J. et Sommerville, J. (2006)**

Detection of *Serpula lacrymans* infestation with a polypyrrole sensor array.  
*Sensors and Actuators B: Chemical*, **113** (2), 989-997.

**Hannoe, S., Sugimoto, I., Yanagisawa, K. et Kuwano, H. (1997)**

Enhanced chromatographic performance of silicon-micromachined capillary column with clean structure and interactive plasma organic films.  
*Transducers 97*, **2C2.05**, 515-518.

**Harsanyi, G. (1995a)**

Sensor structures with sensitive polymers.  
*In: Polymer films in sensor applications: Technology, materials, devices and their characteristics*, Technomic, p. 53-93.

**Harsanyi, G. (1995b)**

Sensor technologies.  
*In: Polymer films in sensor applications: Technology, materials, devices and their characteristics*, Technomic, p. 1-53.

**Haugland, R. A., Varma, M., Wymer, L. J. et Vesper, S. J. (2004)**

Quantitative PCR Analysis of Selected *Aspergillus*, *Penicillium* and *Paecilomyces* Species.  
*Systematic and Applied Microbiology*, **27** (2), 198-210.

**Heilig, A., Bârsan, N., Weimar, U., Schweizer-Berberich, M., Gardner, J. W. et Göpel, W. (1997)**

Gas identification by modulating temperatures of SnO<sub>2</sub>-based thick film sensors.  
*Sensors and Actuators B: Chemical*, **43** (1-3), 45-51.

**Heinze, J. et Dietrich, M. (1989)**

Cyclic voltammetry as a tool for characterizing conducting polymers.  
*Materials science forum*, **42**, 63-78.

**Helmig, D. (1999)**

Air analysis by gas chromatography.  
*Journal of Chromatography A*, **843** (1-2), 129-146.

**Hierlemann, A., Lange, D., Hagleitner, C., Kerness, N., Koll, A., Brand, O. et Baltes, H. (2000)**

Application-specific sensor systems based on CMOS chemical microsensors.  
*Sensors and Actuators B: Chemical*, **70** (1-3), 2-11.

- Hierlemann, A., Weimar, U., Kraus, G., Schweizer-Berberich, M. et Göpel, W. (1995)**  
 Polymer-based sensor arrays and multicomponent analysis for the detection of hazardous organic vapours in the environment.  
*Sensors and Actuators B: Chemical*, **26** (1-3), 126-.
- Hlavay, J. et Guilbault, G. G. (1977)**  
 Applications of the piezoelectric crystal detector in analytical chemistry.  
*Analytical chemistry*, **49** (13), 1890.
- Hodgins, D. (1995)**  
 The development of an electronic 'nose' for industrial and environmental applications.  
*Sensors and Actuators B: Chemical*, **27** (1-3), 255-258.
- Holmberg, M., Winqvist, F., Lundström, I., Gardner, J. W. et Hines, E. L. (1995)**  
 Identification of paper quality using a hybrid electronic nose.  
*Sensors and Actuators B: Chemical*, **27** (1-3), 246-249.
- Horrillo, M. C., Fernandez, M. J., Fontecha, J. L., Sayago, I., Garcia, M., Aleixandre, M., Santos, J. P., Ares, L., Gutierrez, J., Gracia, I. et Cane, C. (2004)**  
 Detection of volatile organic compounds using surface acoustic wave sensors with different polymer coatings.  
*Thin Solid Films*, **467** (1-2), 234-238.
- Hulin, M., Kirchner, S., Robine, E., Moularat, S. et Annesi-Maesano, I. (2010)**  
 Maladies respiratoires et moisissures détectées à partir des COV<sub>m</sub> dans un échantillon représentatif de logements français.  
*In: CFA 2010, 5e Congrès Francophone d'Allergologie, France.*
- Hurst, W. J. et Martin, R. A. (1998)**  
 High-performance liquid chromatographic determination of ochratoxin A in artificially contaminated cocoa beans using automated sample clean-up.  
*Journal of chromatography A*, **810**, 89-94.
- Hyvärinen, A., Meklin, T., Vepsäläinen, A. et Nevalainen, A. (2002)**  
 Fungi and actinobacteria in moisture-damaged building materials-concentrations and diversity.  
*International Biodeterioration and Biodegradation*, **49** (1), 27-37.
- Ionita, I. (1973)**  
 Contribution to the study of the biodeterioration of works of art and historic monuments, IV. Fungi involved in the deterioration of mural paintings from the monasterier of Moldavia.  
*Revue Roumaine Biologie, Serie de botanic*, **18**, 179-189.
- Ivanov, P., Blanco, F., Gracia, I., Sabate, N., Ruiz, A., Vilanova, X., Correig, X., Fonseca, L., Figueras, E., Santander, J. et Cane, C. (2007)**  
 Improvement of the gas sensor response via silicon  $\mu$ -preconcentrator.  
*Sensors and Actuators B: Chemical*, **127** (1), 288-294.
- Jaffrezic-Renault, N., Martelet, C. et Clechet, P. (1994)**  
 Capteurs chimiques et biochimiques.  
*Techniques de l'ingénieur*, **P1** (PE360), 1-20.
- Janinska, B. (2000)**  
 Environmental requirements for fungi.  
*Journal of Thermal Envelope and Building Science Publisher*, **23**, 339-48.
- Jin, C., Kurzawski, P., Hierlemann, A. et Zellers, E. T. (2008)**  
 Evaluation of multitransducer arrays for the determination of organic vapor mixtures.  
*Analytical chemistry*, **80**, 227-236.

- Joblin, Y., Moularat, S., Anton, R., Bousta, F., Oriol, G., Robine, E. et Bourouina, T. (2010a)**  
Moulds Detection by their Volatile Organics Compounds: Use for Heritage Conservation.  
*In: Indoor Air Quality 2010*, Chalon-sur-Saône, France, 59.
- Joblin, Y., Moularat, S., Anton, R., Bousta, F., Oriol, G., Robine, E., Picon, O. et Bourouina, T. (2010b)**  
Detection of moulds by volatile organic compounds: Application to heritage conservation.  
*International Biodeterioration & Biodegradation*, **64** (3), 210-217.
- Jonsson, A., Winqvist, F., Schnürer, J., Sundgren, H. et Lundström, I. (1997)**  
Electronic nose for microbial quality classification of grains.  
*International Journal of Food Microbiology*, **35** (2), 187-193.
- Joo, B.-S., Huh, J.-S. et Lee, D.-D. (2007)**  
Fabrication of polymer SAW sensor array to classify chemical warfare agents.  
*Sensors and Actuators B: Chemical*, **121** (1), 47-53.
- Judy, J. W. (2001)**  
Microelectromechanical systems (MEMS): fabrication, design and applications.  
*Journal of Smart Materials and Structures*, **10** (6), 1115-1134.
- Kaur, M., Aswal, D. K. et Yakhmi, J. V. (2007)**  
Chemiresistor gas sensors: Materials, mechanisms and fabrication.  
*In: Science and technology of chemiresistor gas sensors*, Aswal, D. K. et Gupta, S. K., Nova, New york, p. 33-95.
- Keller, R., Senkpiel, K. et Ohgke, H. (2001)**  
Use of MVOC measurement and odor perception as indicator of mould in indoor areas.  
*In: Bioaerosols, fungi and mycotoxins: health effects, assessment, prevention and control*, Johanning, E., New York, p. 532-537.
- Keshri, G. et Magan, N. (2000)**  
Detection and differentiation between mycotoxigenic and non-mycotoxigenic strains of two *Fusarium* spp. using volatile production profiles and hydrolytic enzymes.  
*Journal of Applied Microbiology*, **89** (5), 825-833.
- Kim, M. et Mitra, S. (2003)**  
A microfabricated microconcentrator for sensors and gas chromatography.  
*Journal of Chromatography A*, **996** (1-2), 1-11.
- Kirchner, S., Arenes, J.-F., Cochet, C., Derbez, M., Duboudin, C., Elias, P., Gregoire, A., Jedor, B., Lucas, J.-P., Pasquier, N., Pignoret, M. et Ramalho, O. (2006)**  
Campagne Nationale Logements: état de la qualité de l'air dans les logements français.  
*CSTB - Observatoire de la Qualité de l'Air Intérieur*, DDD/SB – 2006-57, pp.165.
- Kirchner, S., Cochet, C., Derbez, M., Dubouin, C., Elias, P., Gregoire, A., Jedor, B., Lucas, J., Pasquier, N., Pignoret, M. et Ramalho, O. (2007)**  
Indoor air quality in French housing.  
*Environnement, Risques & Santé*, **6** (4), 259-269.
- Kiviranta, H., Tuomainene, A., Reiman, M., Laitinen, S., Liesivuori, J. et Nevalainen, A. (1998)**  
Quantitative identification of volatile metabolites from two fungi and three bacteria species cultivated on two media.  
*Central European Journal of Public Health*, **6** (4), 296-299.
- Koester, C. J. et Moulik, A. (2005)**  
Trends in environmental analysis.  
*Analytical chemistry*, **77** (12), 3737-3754.

**Kohl, D. (1997)**

Semiconductor and calorimetric sensor devices and arrays.

*In: Handbook of Biosensors and Electronic Noses - Medicine, Food, and the Environment*, Kress-Rogers, E., CRC, p. 533-561.

**Kohl, D. (2001)**

Function and applications of gas sensors.

*Journal of Physics D: Applied Physics*, **34**, R125-R149.

**Köhler, M. (1999)**

Etching Methods.

*In: Etching in Microsystem Technology*, Wiley-vch, p. 29-169.

**Kolesar, E. S. et Reston, R. R. (1994)**

Silicon-microfabricated gas chromatography system used to separate and detect ammonia and nitrogen dioxide - Part II: Evaluation, analysis, and theoretical modeling of the gas chromatography system.

*Journal of microelectromechanical systems*, **3** (4), 147-154.

**Kolesar, E. S. J. et Reston, R. R. (1998)**

Review and summary of a silicon micromachined gas chromatography system.

*IEEE transactions on components, packaging, and manufacturing technology*, **21** (4), 324-328.

**Korpi, A., Kasanen, J., Alarie, Y., Kosma, V. et Pasanen, A. (1999)**

Sensory irritating potency of some microbial volatile organic compound (MVOCs) and a mixture of five MVOCs.

*Archives of Environmental Health*, **54** (5), 347-352.

**Korpi, A., Pasanen, A.-L. et Pasanen, P. (1998)**

Volatile compounds originating from mixed microbial cultures on building materials under various humidity conditions.

*Applied and Environmental Microbiology*, **64** (8), 2914-2919.

**Korpi, A., Pasanen, A. L., Pasanen, P. et Kalliokoski, P. (1997)**

Microbial growth and metabolism in house dust.

*International Biodeterioration & Biodegradation*, **40** (1), 19-27.

**Kowalski, W. J., Bahnfleth, W. P., Witham, D. L., Severin, B. F. et Whittam, T. S. (2000)**

Mathematical modeling of ultraviolet germicidal irradiation for air disinfection.

*Quantitative Microbiology*, **2** (3), 249-270.

**Kreja, L. et Seidel, H.-J. (2002)**

On the cytotoxicity of some microbial volatile organic compounds as studied in the human lung cell line A549.

*Chemosphere*, **49**, 105-110.

**Krishnamachari, K. A. V., Bhat, R. V., Nagarajan, V. et Tilak, T. B. G. (1975)**

Hepatitis due to aflatoxicosis. An outbreak in western India.

*The Lancet*, **1**, 1061-1063.

**Kroupa, A., Dewulf, J., Van Langenhove, H. et Viden, I. (2004)**

Breakthrough characteristics of volatile organic compounds in the -10 to +170 °C temperature range on Tenax TA determined by microtrap technology.

*Journal of Chromatography A*, **1038** (1-2), 215-223.

**Kuske, M., Padilla, M., Romain, A.-C., Nicolas, J., Rubio, R. et Marco, S. (2006)**

Detection of diverse mould species growing on building materials by gas sensor arrays and pattern recognition.

*Sensors and Actuators B: Chemical*, **119** (1), 33-40.

**Kuske, M., Romain, A.-C. et Nicolas, J. (2005)**

Microbial volatile organic compounds as indicators of fungi. Can an electronic nose detect fungi in indoor environments?

*Building and Environment*, **40**, 824-831.

**Lambertus, G. R., Elstro, A., Sensenig, K., Potkay, J. A., Agah, M., Scheuering, S., Wise, K. D., Dorman, F. et Sacks, R. D. (2004)**

Design, fabrication, and evaluation of microfabricated columns for gas chromatography.

*Analytical chemistry*, **76** (9), 2629-2637.

**Lampe, U., Simon, E., Pohle, R., Fleischer, M., Meixner, H., Frerichs, H. P., Lehmann, M. et Kiss, G. (2005)**

GasFET for the detection of reducing gases.

*Sensors and Actuators B: Chemical*, **111-112**, 106.

**Lang, H. P., Baller, M. K., Berger, R., Gerber, C., Gimzewski, J. K., Battiston, F. M., Fornaro, P., Ramseyer, J. P., Meyer, E. et Güntherodt, H. J. (1999)**

An artificial nose based on a micromechanical cantilever array.

*Analytica Chimica Acta*, **393** (1-3), 59-65.

**Lange, D., Hagleitner, C., Hierlemann, A., Brand, O. et Baltes, H. (2002)**

Complementary metal oxide semiconductor cantilever arrays on a single chip: mass-sensitive detection of volatile organic compounds.

*Analytical chemistry*, **74**, 3084-3095.

**Lange, U., Roznyatovskaya, N. V. et Mirsky, V. M. (2008)**

Conducting polymers in chemical sensors and arrays.

*Analytica Chimica Acta*, **614** (1), 1-26.

**Lee, D.-S., Jung, J.-K., Lim, J.-W., Huh, J.-S. et Lee, D.-D. (2001)**

Recognition of volatile organic compounds using SnO<sub>2</sub> sensor array and pattern recognition analysis.

*Sensors and Actuators B: Chemical*, **77** (1-2), 228-236.

**Lee, D.-S., Kim, Y. T., Huh, J.-S. et Lee, D.-D. (2002)**

Fabrication and characteristics of SnO<sub>2</sub> gas sensor array for volatile organic compounds recognition.

*Thin Solid Films*, **416** (1-2), 271-278.

**Lee, K. et Ramamurthi, M. (1993)**

Filter collection.

*In: Aerosol measurement, principles techniques and applications*, New York, p. 179-205.

**Lewis, P. R., Manginell, R. P., Adkins, D. R., Kottenstette, R. J., Wheeler, D. R., Sokolowski, S. S., Trudell, D. E., Byrnes, J. E., Okandan, M., Bauer, J. M., Manley, R. G. et Frye-Mason, G. C. (2006)**

Recent advancements in the gas-phase MicroChemLab.

*IEEE sensors journal*, **6** (3), 784-795.

**Li, B., Santhanam, S., Schultz, L., Jeffries-El, M., Iovu, M. C., Sauv e, G., Cooper, J., Zhang, R., Revelli, J. C., Kusne, A. G., Snyder, J. L., Kowalewski, T., Weiss, L. E., McCullough, R. D., Fedder, G. K. et Lambeth, D. N. (2007a)**

Inkjet printed chemical sensor array based on polythiophene conductive polymers.

*Sensors and Actuators B: Chemical*, **123** (2), 651-660.

**Li, Y., Vancura, C., Barrettino, D., Graf, M., Hagleitner, C., Kummer, A., Zimmermann, M., Kirstein, K. U. et Hierlemann, A. (2007b)**

Monolithic CMOS multi-transducer gas sensor microsystem for organic and inorganic analytes.

*Sensors and Actuators B: Chemical*, **126** (2), 431-440.

**Libardoni, M., Stevens, P. T., Waite, J. H. et Sacks, R. (2006)**

Analysis of human breath samples with a multi-bed sorption trap and comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC × GC).

*Journal of Chromatography B*, **842** (1), 13-21.

**Llobet, E., Vilanova, X., Brezmes, J., Sueiras, J. E. et Correig, X. (1998)**

Transient response of thick-film tin oxide gas-sensors to multicomponent gas mixtures.

*Sensors and Actuators B: Chemical*, **47** (1-3), 104-112.

**Lochon, F. (2007)**

Développement de microcapteurs chimiques à base de micropoutres dédiés au contrôle de la qualité de l'air: détection temps réel de Composés Organiques Volatils (COV).

*PhD Thesis*, Bordeaux 1 university

**Lochon, F., Fadel, L., Dufour, I., Rebière, D. et Pistré, J. (2006)**

Silicon made resonant microcantilever: Dependence of the chemical sensing performances on the sensitive coating thickness.

*Materials Science and Engineering: C*, **26** (2-3), 348.

**Lu, C.-J., Steinecker, W. H., Tian, W.-C., Oborny, M. C., Nichols, J. M., Agah, M., Potkay, J. A., Chan, H. K. L., Driscoll, J., Sacks, R. D., Wise, K. D., Pang, S. W. et Zellers, E. T. (2005)**

First-generation hybrid MEMS gas chromatograph.

*Lab on a chip*, **5**, 1123-1131.

**Lu, C.-J., Tian, W.-C., Steinecker, W. H., Guyon, A., Agah, M., Oborny, M. C., Sacks, R. D., Wise, K. D., Pang, S. W. et Zellers, E. T. (2003a)**

Functionally integrated MEMS gas chromatograph subsystem.

*In: 7th International Conference on Miniaturized Chemical and Biochemical Analysis Systems*, Squaw Valley, California USA, 411-415.

**Lu, C.-J., Whiting, J. J., Sacks, R. D. et Zellers, E. T. (2003b)**

Portable gas chromatograph with tunable retention and sensor array detection for determination of complex vapor mixtures.

*Analytical chemistry*, **75** (6), 1400-1409.

**Lu, C.-J. et Zellers, E. T. (2002)**

Multi-adsorbent preconcentration/focusing module for portable-GC/microsensor-array analysis of complex vapor mixtures.

*Analyst*, **127** (8), 1061-1068.

**Lyles, W. B., Greve, K. W., Bauer, R. M., Ware, M. R., Schramke, C. J., Crouch, J. et Hicks, A. (1991)**

Sick building syndrome.

*Southern Medical Journal*, **84** (1), 65-71.

**Madelin, T. (1994)**

Fungal aerosols: a review.

*Journal of Aerosol Science*, **25** (8), 1405-1412.

**Magan, N. et Evans, P. (2000)**

Volatiles as an indicator of fungal activity and differentiation between species, and the potential use of electronic nose technology for early detection of grain spoilage.

*Journal of Stored Products Research*, **36** (4), 319-340.

**Mainelis, G., Adikhari, A., Willeke, K., Lee, S., Reponen, T. et Grinshpun, S. (2002)**

Collection of airborne microorganism by a new electrostatic precipitator.

*Journal of Aerosol Science*, **33** (8), 1417-1433.

**Manginell, R. P., Frye-Mason, G. C., Kottenstette, R. J., Lewis, P. R. et Wong, C. C. (2000)**

Microfabricated planar preconcentrator.

*In: IEEE Solid-State Sensor And Actuator Workshop*, Cleveland, 179-182.

- Manginell, R. P., Okandan, M., Kottenstette, R. J., Lewis, P. R., Adkins, D. R., Bauer, J. M., Manley, R. G., Sokolowski, S. S. et Shul, R. J. (2003)**  
 Monolithically-Integrated MicroChemLab for Gas-Phase Chemical Analysis.  
*In: Proceedings of the Micro-TAS 2003 Workshop, Squaw Valley, California, USA, 2, 1247-1250.*
- Manz, A., Graber, N. et Widmer, H. M. (1990)**  
 Miniaturized total chemical analysis systems: A novel concept for chemical sensing.  
*Sensors and Actuators B: Chemical, 1 (1-6), 244-248.*
- Matchman, S. E., Jordan, B. R. et Wood, D. A. (1985)**  
 Estimation of fungal biomass in a solid substrate by three independent methods.  
*Applied Microbiology and Biotechnology, 21, 108-112.*
- Mazet, L. (2004)**  
 Réalisation et caractérisation de structures micro-électroniques à base de semiconducteur III-V (InP).  
 Application capteur de gaz.  
*PhD Thesis, Blaise Pascal University - Clermont II*
- McEntegart, C. M., Penrose, W. R., Strathmann, S. et Stetter, J. R. (2000)**  
 Detection and discrimination of coliform bacteria with gas sensor arrays.  
*Sensors and Actuators B: Chemical, 70 (1-3), 170-176.*
- McGovern, S. T., Spinks, G. M. et Wallace, G. G. (2005)**  
 Micro-humidity sensors based on a processable polyaniline blend.  
*Sensors and Actuators B: Chemical, 107 (2), 657-665.*
- Menz, W., Mohr, J. et Paul, O. (2001)**  
 Silicon Microsystem Technology.  
*In: Microsystem Technology, Wiley-vch, p. 209-287.*
- Miller, J., Laflamme, A., Sobol, Y., Lafontaine, P. et Greenhal, G. (1988)**  
 Fungi and fungal products in some Canadian houses.  
*International Biodeterioration and Biodegradation, 24, 103-120.*
- Miller, J. D. (1990)**  
 Fungi as contaminants in indoor air.  
*Indoor air 90, 51-64.*
- Miller, J. D. et Young, J. C. (1997)**  
 The use of ergosterol to measure exposure to fungal propagules in indoor air.  
*American industrial hygiene association journal, 58, 39-43.*
- Mir, S. et Martinez, S. (2002)**  
 Introduction aux microsystemes sur silicium.  
*In: Conception des microsystemes sur silicium, Mir, S., Hermes Science Publications, Paris, p. 19-38.*
- Mitra, S., Xu, Y. H., Chen, W. et Lai, A. (1996)**  
 Characteristics of microtrap-based injection systems for continuous monitoring of volatile organic compounds by gas chromatography.  
*Journal of Chromatography A, 727 (1), 111-118.*
- Mizaikoff, B. (2003)**  
 Mid-infrared fiberoptic sensors: Potential and perspectives.  
*Analytical chemistry, 75 (11), 258A-267A.*
- Montana, E., Etzel, R., Allan, T., Horgan, T. et Dearborn, D. (1997)**  
 Environmental Risk Factors Associated with Pediatric Idiopathic Pulmonary Hemorrhage and Hemosiderosis in a Cleveland Community.  
*American Academy of Pediatrics, 99 (1), 1-8.*



**Montmeat, P., Pijolat, C., Riviere, B., Tournier, G. et Viricelle, J.-P. (2002)**

Effect of a platinum membrane on the sensing properties of materials based on thin and thick tin dioxide films.  
*Materials Science and Engineering: C*, **21** (1-2), 113-123.

**Morrison, J., Yang, C., Lin, K. T., Haugland, R. A., Neely, A. N. et Vesper, S. J. (2004)**

Monitoring *Aspergillus* species by quantitative PCR during construction of a multi-storey hospital building.  
*Journal of Hospital Infection*, **57** (1), 85-87.

**Morvan, M., Talou, T. et Beziau, J.-F. (2003)**

MOS-MOSFET gas sensors array measurements versus sensory and chemical characterisation of VOC's emissions from car seat foams.  
*Sensors and Actuators B: Chemical*, **95** (1-3), 212-223.

**Moularat, S. (2005)**

Etude de la contamination fongique des environnements intérieurs par la détermination et la mesure de traceurs chimiques spécifiques: application à l'hygiène de l'habitat.  
*PhD Thesis*, Marne-la-Vallée University

**Moularat, S. (2007)**

Procédé de détection d'une contamination fongique.  
*INPI n°07 01578*, France

**Moularat, S., Derbez, M., Kirchner, S., Ramalho, O. et Robine, E. (2008a)**

Détermination de la contamination fongique des logements français par un indice chimique.  
*Pollution Atmosphérique*, **197**, 37-44.

**Moularat, S. et Robine, E. (2008)**

A method to determine the transfer of mycotoxins from materials to air.  
*Clean, soil, air, water*, **36** (7), 578-583.

**Moularat, S., Robine, E., Ramalho, O. et Oturan, M. A. (2008b)**

Detection of fungal development in a closed environment through the identification of specific VOC: Demonstration of a specific VOC fingerprint for fungal development.  
*Science of the Total Environment*, **407**, 139-146.

**Moularat, S., Robine, E., Ramalho, O. et Oturan, M. A. (2008c)**

Detection of fungal development in closed spaces through the determination of specific chemical targets.  
*Chemosphere*, **72** (2), 224-232.

**Nakamoto, T., Isaka, Y., Ishige, T. et Moriizumi, T. (2000)**

Odor-sensing system using preconcentrator with variable temperature.  
*Sensors and Actuators B: Chemical*, **69** (1-2), 58-62.

**Nakamura, H. (1987)**

Sterilization efficacy of ultraviolet irradiation on microbial aerosols under dynamic airflow by experimental air conditioning systems.  
*The Bulletin Board of Tokyo Medical and Dental University*, **34**, 25-40.

**Needham, R., Williams, J., Beales, N., Voysey, P. et Magan, N. (2005)**

Early detection and differentiation of spoilage of bakery products.  
*Sensors and Actuators B: Chemical*, **106** (1), 20-23.

**Nevalainen, A., Willeke, K., Liebhaber, F., Pastuszka, J., Burge, H. et Henningson, E. (1993)**

Bioaerosol Sampling.  
*In: Aerosol measurement principles, techniques and applications*, New York, p. 471-492.

**Ngo, K. A. (2006)**

Etude d'un système multicapteur pour la détection sélective des gaz.  
*PhD Thesis*, Paul Cezanne University - Aix-Marseille III

**Nieuwenhuizen, M. S. et Nederlof, A. J. (1992)**

Silicon based surface acoustic wave gas sensors.

*In: Sensors and sensory systems for an electronic nose*, Gardner, J. W. et Bartlett, P. N., Nato asi, **Serie E vol.212**, p. 131-145.

**Noh, H.-s., Hesketh, P. J. et Frye-Mason, G. C. (2002)**

Parylene gas chromatographic column for rapid thermal cycling.

*Journal of microelectromechanical systems*, **11** (6), 718-725.

**Nolard, N. (1997)**

Moisissures et allergies respiratoires.

*Expression*, **5**, 7-16.

**Nugaeva, N., Gfeller, K. Y., Backmann, N., Lang, H. P., Düggelin, M. et Hegner, M. (2005)**

Micromechanical cantilever array sensors for selective fungal immobilization and fast growth detection.

*Biosensors and Bioelectronics*, **21** (6), 849-856.

**Olsson, J., Börjesson, T., Lundstedt, T. et Schnürer, J. (2000)**

Volatiles for mycological quality grading of barley grains: determinations using gas chromatography-mass spectrometry and electronic nose.

*International Journal of Food Microbiology*, **59** (3), 167-178.

**Oppliger, A., Charriere, N., Droz, P.-O. et Rinsoz, T. (2008)**

Exposure to Bioaerosols in Poultry Houses at Different Stages of Fattening; Use of Real-time PCR for Airborne Bacterial Quantification.

*Annals of Occupational Hygiene*, **52** (5), 405-412.

**Osharov, N. et May, G. S. (2001)**

The molecular mechanisms of conidial germination.

*FEMS Microbiology Letter*, **199** (2, 30 May 2001), 153-160.

**Panasenko, V. T. (1967)**

Ecology of microfungi.

*The botanical review*, **33**, 189-215.

**Paolesse, R., Alimelli, A., Martinelli, E., Natale, C. D., D'Amico, A., D'Egidio, M. G., Aureli, G., Ricelli, A. et Fanelli, C. (2006)**

Detection of fungal contamination of cereal grain samples by an electronic nose.

*Sensors and Actuators B: Chemical*, **119** (2), 425-430.

**Pasanen, A.-L., Lappalainen, S. et Pasanen, P. (1996)**

Volatile organic metabolites associated with some toxic fungi and their mycotoxins.

*The analyst*, **121**, 1949-1953.

**Pasanen, A.-L., Yli-Pietila, K., Pasanen, P., Kalliokoski, P. et Tarhanen, J. (1999)**

Ergosterol content in various fungal species and biocontaminated building materials.

*Applied and environmental microbiology*, **65** (1), 138-142.

**Pasanen, A., Korpi, A., Kasanen, J.-P. et Pasanen, P. (1998)**

Critical aspects on the significance of microbial metabolites as indoor air pollutants.

*Environment International*, **24** (7), 703-712.

**Pasanen, A. L. (2001)**

A review: fungal exposure assessment in indoor environments.

*Indoor Air*, **11**, 87-98.

**Pasanen, A. L., Nikulin, M., Tuomainen, M., Berg, S., Parikka, P. et Hintikka, E.-L. (1993)**

Laboratory experiments on membrane filter sampling of airborne mycotoxins produced by *Stachybotrys atra corda*.

*Atmospheric Environment*, **27** (A), 9-13.

**Paulsson, N. J. P. et Winqvist, F. (1999)**

Analysis of breath alcohol with a multisensor array: instrumental setup, characterization and evaluation.  
*Forensic Science International*, **105** (2), 95-114.

**Pearce, T. C. (1997)**

Computational Parallels between the biological olfactory pathway and its analogue 'the electronic nose': Part II. Sensor-based machine olfaction.  
*Biosystems*, **41** (2), 69-90.

**Pejic, B., Eadington, P. et Ross, A. (2007)**

Environmental monitoring of hydrocarbons: A chemical sensor perspective.  
*Environmental Science & Technology*, **41** (18), 6333-6342.

**Penza, M. et Cassano, G. (2003)**

Application of principal component analysis and artificial neural networks to recognize the individual VOCs of methanol/2-propanol in a binary mixture by SAW multi-sensor array.  
*Sensors and Actuators B: Chemical*, **89** (3), 269-284.

**Permuy, A., Donzier, E. et Rezgui, F. (2004)**

Capteurs micro-électroniques.  
*Techniques de l'ingénieur*, **4** (E3093), 1-17.

**Persaud, K. C. et Pelosi, P. (1992)**

Sensor arrays using conducting polymers for an artificial nose.  
*In: Sensors and sensory systems for an electronic nose*, Gardner, J. W. et Bartlett, P. N., Nato asi, **Serie E vol.212**, p. 31-51.

**Pijolat, C., Camara, M., Courbat, J., Viricelle, J. P., Briand, D. et de Rooij, N. F. (2007)**

Application of carbon nano-powders for a gas micro-preconcentrator.  
*Sensors and Actuators B: Chemical*, **127** (1), 179-185.

**Potkay, J. A., Driscoll, J., Agah, M., Sacks, R. D. et Wise, K. D. (2003)**

A high-performance microfabricated gas chromatography column.  
*In: MEMS 2003, The Sixteenth Annual International Conference on Micro Electro Mechanical Systems*, Kyoto, 395-398.

**Potkay, J. A., Lambertus, G. R., Sacks, R. D. et Wise, K. D. (2006)**

A low-power pressure- and temperature-programmable  $\mu$ GC column.  
*In: Solid-state sensors, actuators, and microsystems workshop*, Hilton Head Island, South Carolina, 144-147.

**Prescott, L., Harley, J. et Klein, D. (1995)**

*In* Microbiologie. De Boeck universite, Bruxelles.

**Rakow, N. A. et Suslick, K. S. (2000)**

A colorimetric sensor array for odour visualization.  
*Nature*, **406**, 710-713.

**Ramalho, O. (1999)**

Vers une méthodologie olfactive de la qualité de l'air intérieur. Correspondances entre les données de l'analyse sensorielle, de l'analyse chimique et d'un "nez électronique".  
*PhD Thesis*, Paris 7 Denis Diderot University

**Rebière, D. (1992)**

Capteurs à ondes acoustiques de surface - Application à la détection des gaz.  
*PhD Thesis*, Bordeaux I University

**Reidy, S., Lambertus, G., Reece, J. et Sacks, R. (2006)**

High-performance, static-coated silicon microfabricated columns for gas chromatography.  
*Analytical chemistry*, **78** (8), 2623-2630.

**Reidy, S. M., George, D., Agah, M. et Sacks, R. D. (2007)**

Temperature programmed GC using Silicon microfabricated columns with integrated heaters and temperature sensors.

*Analytical chemistry*, **79**, 2911-2917.

**Renoux, A. et Boulaud, D. (1998)**

In *Les aérosols - Physique et métrologie*.

*Tec & Doc*, Paris.

**Reston, R. R. et Kolesar, E. S. (1994)**

Silicon-microfabricated gas chromatography system used to separate and detect ammonia and nitrogen dioxide - Part I: Design, fabrication, and integration of the gas chromatography system.

*Journal of microelectromechanical systems*, **3** (4), 134-146.

**Rinsoz, T., Duquenne, P., Greff-Mirguet, G. et Oppliger, A. (2008)**

Application of real-time PCR for total airborne bacterial assessment: Comparison with epifluorescence microscopy and culture-dependent methods.

*Atmospheric Environment*, **42** (28), 6767-6774.

**Robine, E., Lacaze, I., Moularat, S., Ritoux, S. et Boissier, M. (2005)**

Characterisation of exposure to airborne fungi: Measurement of ergosterol.

*Journal of Microbiological Methods*, **63** (2), 185-192.

**Roitt, I. M., Brostoff, J. et Male, D. K. (1985)**

In *Immunologie fondamentale et appliquée*.

*Médecine et Sciences Internationales*, Paris.

**Ruiz, A. M., Gràcia, I., Sabaté, N., Ivanov, P., Sánchez, A., Duch, M., Gerbolés, M., Moreno, A. et Cané, C. (2007)**

Membrane-suspended microgrid as a gas preconcentrator for chromatographic applications.

*Sensors and Actuators A: Physical*, **135** (1), 192-196.

**Rylander, R. (1997)**

(1-3)-beta-D-glucan and airway disease in a day-care center before and after renovation.

*Archives of Environmental Health*, **52**, 281-285.

**Sagisaka, S., Ando, M., Iyoda, T. et Shimidzu, T. (1993)**

Preparation and properties of amphiphilic polythiophene Langmuir-Blodgett films.

*Thin Solid Films*, **230** (1), 65-69.

**Sahgal, N. et Magan, N. (2008)**

Fungal volatile fingerprints: discrimination between dermatophyte species and strains by means of an electronic nose.

*Sensors and Actuators B: Chemical*, **131**, 117-120.

**Sanchez, J.-B. (2005)**

Conception d'une micro-colonne chromatographique couplée à un capteur à oxyde semi-conducteur: application à la détection sélective de HF.

*PhD Thesis*, Franche-comté university

**Sanchez, J.-B., Berger, F., Fromm, M. et Nadal, M.-H. (2006)**

A selective gas detection micro-device for monitoring the volatile organic compounds pollution.

*Sensors and Actuators B: Chemical*, **119** (1), 227-233.

**Sand, W. (1997)**

Microbial mechanisms of deterioration of inorganic substrates-A general mechanistic overview.

*International Biodeterioration and Biodegradation*, **40** (2-4), 183-190.

- Schiffman, S. S., Wyrick, D. W., Gutierrez-Ozuna, R. et Nagle, H. T. (2000)**  
Effectiveness of an Electronic Nose for Monitoring Bacterial and Fungal Growth.  
*In: 7th International Symp. On Olfaction and Electronic Nose*, Brighton, UK, 1-8.
- Schleibinger, H., Brattig, C., Mangler, M., Samwer, H., Laubmann, D., Eis, D., Braun, P., Marchl, D., Nickelmann, A. et Ruden, H. (2002)**  
Microbial Volatile Organic Compounds (MVOC) as indicators for fungal damage.  
*In: 9th International Conference on Indoor Air Quality and Climate*, Monterey, California, 707-712.
- Schleibinger, H. et Ruden, H. (1999)**  
Air filters from HVAC systems as possible source of Volatile Organic Compounds (VOC)-laboratory and field assays.  
*Atmospheric Environment*, **33**, 4571-4577.
- Schmidt et Etkin, D. (1994)**  
*In Biocontaminants in indoor environments.*  
*Indoor Air Quality Update*, Arlington.
- Schnürer, J., Olsson, J. et Börjesson, T. (1999)**  
Fungal Volatiles as Indicators of Food and Feeds Spoilage.  
*Fungal Genetics and Biology*, **27** (2-3), 209-217.
- Schottland, P. (1998)**  
Synthèse et utilisation de polymères conducteurs comme matière active pour la détection incendie.  
*PhD Thesis*, Paris XIII University
- Schreiber, F. W. (2000)**  
Perceived air quality: investigation of the non-sensory odor assessment in indoor environments.  
*PhD Thesis*, Technical University of Berlin
- Schweizer-Berberich, M., Strathmann, S., Göpel, W., Sharma, R. et Peyre-Lavigne, A. (2000)**  
Filters for tin dioxide CO gas sensors to pass the UL2034 standard.  
*Sensors and Actuators B: Chemical*, **66** (1-3), 34-36.
- Seiyama, T., Kato, A., Fujiishi, K. et Nagatani, M. (1962)**  
A new detector for gaseous components using semiconductor thin film.  
*Analytical chemistry*, **34** (11), 1502-1503.
- Serpinet, J. (1995a)**  
Chapitre I: Introduction à la chromatographie en phase gazeuse.  
*In: Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse*, Tranchant, J., Masson, Paris, **4ème édition**, p. 12-64.
- Serpinet, J. (1995b)**  
Chapitre II: La séparation chromatographique – L’apport de la théorie.  
*In: Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse*, Tranchant, J., Masson, Paris, **4ème édition**, p. 12-64.
- Serrano, G., Reidy, S. M. et Zellers, E. T. (2009)**  
Assessing the reliability of wall-coated microfabricated gas chromatographic separation columns.  
*Sensors and Actuators B: Chemical*, **141** (1), 217-226.
- Seyama, M., Sugimoto, I. et Miyagi, T. (2002)**  
Application of an array sensor based on plasma-deposited organic film coated quartz crystal resonators to monitoring indoor volatile compounds.  
*IEEE sensors journal*, **2** (5), 422-427.

**Seyama, M., Sugimoto, I. et Nakamura, M. (2004)**

Aroma sensing and indoor air monitoring by quartz crystal resonators with sensory films prepared by sputtering of biomaterials and sintered polymers.

*Biosensors and Bioelectronics*, **20** (4), 814-824.

**Shirakawa, H., Louis, E. J., MacDiarmid, A. G., Chiang, C. K. et Heeger, A. J. (1977)**

Synthesis of electrically conducting organic polymers: halogen derivatives of polyacetylene, (CH)<sub>x</sub>.

*Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, (16), 578-580.

**Si, P., Mortensen, J., Komolov, A., Denborg, J. et Moller, P. J. (2007)**

Polymer coated quartz crystal microbalance sensors for detection of volatile organic compounds in gas mixtures.

*Analytica Chimica Acta*, **597** (2), 223-230.

**Singh, J. (1994)**

Management of decay and health in buildings.

In: *Building mycology*, E & FN SPON, **6**, p. 298-309.

**Skotheim, T. A. et Reynolds, J. R. (1998)**

In Conjugated polymers: theory, synthesis, properties, and characterization.

*Handbook of conducting polymers*, CRC press, New york.

**Snajberk, K. et Zavarin, E. (1975)**

Composition of turpentine from *Pinus edulis* wood oleoresin.

*Phytochemistry*, **14** (9), 2025-2028.

**Sorenson, W. (1999)**

Fungal spores: hazardous and health.

*Environmental Health Perspectives*, **107** (3), 469-472.

**Steinecker, W. H., Rowe, M. P., Matzger, A. et Zellers, E. T. (2003)**

Chemiresistor array with nanocluster interfaces as a micro-GC detector.

In: *Transducers '03, The 12th International Conference on Solid State Sensors, Actuators and Microsystems*, Boston, **3E44.P**, 1343-1346.

**Stetzenbach, L. D., Buttner, M. P. et Cruz, P. (2004)**

Detection and enumeration of airborne biocontaminants.

*Current Opinion in Biotechnology*, **15** (3), 170-174.

**Ström, G., West, J., Wessen, B. et Palgren, U. (1994)**

Quantitative analysis of microbial volatiles in damp swedish houses.

In: *Health implication of fungi in indoor environments.*, Samson, R. A., Flannigan, B., Flannigan, M. E., Verhoeff, A. P., Adan, O. C. G. et Hoekstra, E. S., Amsterdam, **2**, p. 291-305.

**Sunesson, A.-L., Nilsson, C.-A., Andersson, B. et Blomquist, G. (1996)**

Volatile metabolites produced by two fungal species cultivated on building materials.

*Annals of Occupational Hygiene*, **40** (4), 397-410.

**Teasdale, P. R. et Wallace, G. G. (1993)**

Molecular recognition using conducting polymers: basis of an electrochemical sensing technology.

*Analyst*, **118** (4), 329-334.

**Terry, S. C., Jerman, J. H. et Angell, J. B. (1979)**

A gas chromatograph air analyzer fabricated on a silicon wafer.

*IEEE Transactions on electron devices*, **26** (12), 1880-1886.

**Thammakhet, C., Thavarungkul, P., Brukh, R., Mitra, S. et Kanatharana, P. (2005)**

Microtrap modulated flame ionization detector for on-line monitoring of methane.

*Journal of Chromatography A*, **1072** (2), 243-248.

**Thorne, P. S. et Heederik, D. (1999)**

Indoor Bioaerosols-Sources and Characteristics.

*In: Organic Indoor Air Pollutants*, Salthammer, T., WILEY-VCH, p. 275-288.

**Tian, W.-C., Chan, H. K. L., Lu, C.-J., Pang, S. W. et Zellers, E. T. (2005)**

Multiple-stage microfabricated preconcentrator-focuser for micro gas chromatography system.

*Journal of microelectromechanical systems*, **14** (3), 498-507.

**Tian, W.-C., Pang, S. W., Lu, C.-J. et Zellers, E. T. (2003)**

Microfabricated preconcentrator-focuser for a microscale gas chromatograph.

*Journal of microelectromechanical systems*, **12** (3), 264-272.

**Tongpool, R. et Yoriya, S. (2005)**

Kinetics of nitrogen dioxide exposure in lead phthalocyanine sensors.

*Thin Solid Films*, **477** (1-2), 148-152.

**Trucksess, M. W. et Polhand, A. E. (2001)**

*In Mycotoxin Protocols*. Humana press.

**Turner, A. P. F. et Magan, N. (2004)**

Electronic noses and disease diagnostics.

*Nature Reviews Microbiology*, **2**, 161-166.

**van Deemter, J. J., Zuiderweg, F. J. et Klinkenberg, A. (1956)**

Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of nonideality in chromatography.

*Chemical Engineering Science*, **5** (24), 271-289.

**Van Lancker, F., Adams, A., Delmulle, B., De Saeger, S., Moretti, A., Van Peteghem, C. et De Kimpe, N. (2008)**

Use of headspace SPME-GC-MS for the analysis of the volatiles produced by indoor molds grown on different substrates.

*Journal of Environmental Monitoring*, **10**, 1127-1133.

**Vancura, C., Ruegg, M., Li, Y., Lange, D., Hagleitner, C., Brand, O., Hierlemann, A. et Baltes, H. (2003)**

Magnetically actuated CMOS resonant cantilever gas sensor for volatile organic compounds.

*In: The 12th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems*, **2**, 1355- 1358.

**Vergara, A., Llobet, E., Brezmes, J., Ivanov, P., Cané, C., Gràcia, I., Vilanova, X. et Correig, X. (2007)**

Quantitative gas mixture analysis using temperature-modulated micro-hotplate gas sensors: Selection and validation of the optimal modulating frequencies.

*Sensors and Actuators B: Chemical*, **123** (2), 1002-1016.

**Vincent, D. et Pradalier, A. (1997)**

Impact sanitaire de la climatisation: qu'en est-il du syndrome des "bâtiments malsains"?

*Revue Médicale Interne*, **18**, 460-469.

**Wady, L., Bunte, A., Pehrson, C. et Larsson, L. (2002)**

Use of gas chromatography-mass spectrometry/solid phase microextraction for the identification of MVOCs from moldy building materials.

*Journal of microbiological methods*, **1717**, 1-8.

**Walinder, R., Wieslander, G., Norback, D., Wessen, B. et Venge, P. (2001)**

Nasal lavage biomarkers: effects of water damage and microbial growth in an office building.

*Archives of Environmental Health*, **56**, 30-36.

**Wan, G. et Li, C. (1998)**

Indoor endotoxin and glucan in association with sick building syndrome.

*Journal Aerosol Science*, **29** (1), S1309-S1310.

- Wanekaya, A. K., Uematsu, M., Breimer, M. et Sadik, O. A. (2005)**  
Multicomponent analysis of alcohol vapors using integrated gas chromatography with sensor arrays.  
*Sensors and Actuators B: Chemical*, **110** (1), 41-48.
- Watzinger, F., Suda, M., Preuner, S., Baumgartinger, R., Ebner, K., Baskova, L., Niesters, H. G. M., Lawitschka, A. et Lion, T. (2004)**  
Real-Time Quantitative PCR Assays for Detection and Monitoring of Pathogenic Human Viruses in Immunosuppressed Pediatric Patients.  
*Journal of Clinical Microbiology*, **42** (11), 5189-5198.
- Weh, T., Fleischer, M. et Meixner, H. (2000)**  
Optimization of physical filtering for selective high temperature H<sub>2</sub> sensors.  
*Sensors and Actuators B: Chemical*, **68** (1-3), 146-150.
- Weidenbörner, M. (2001)**  
In Encyclopedia of food mycotoxins.  
*Applied Microbiology and Biotechnology*, Springer (eds), Giessen.
- Wessen, B., Ström, G. et Palmgren, U. (1999)**  
Microbial problem buildings-analysis and verification.  
In: *the 8th International Conference on Indoor Air quality and Climate*, Edimburgh, **4**, 875-879.
- Wessen, B., Ström, G. et Schoeps, K. O. (1995)**  
MVOC-profiles-a tool for indoor-air quality assessment.  
In: *Indoor Air Quality: An Integrated Approach*, Morawska, L., Bofinger, N. D. et Maroni, M., Amsterdam, p. 67-70.
- WHO Regional Office for Europe (2004)**  
Moulds and moisture.  
*World Health Organization*, **42**, 29.
- Wilkins, K. (2002)**  
Microbial VOC (MVOC) in buildings, their properties and potential use.  
In: *9th International Conference on Indoor Air Quality and Climate*, Monterey, California, 431-436.
- Wilkins, K. et Larsen, K. (1995)**  
Variation of volatile organic compound patterns of mold species from damp buildings.  
*Chemosphere*, **31** (5), 3225-3236.
- Wilkins, K., Larsen, K. et Smikus, M. (2000)**  
Volatile metabolites from mold growth on building materials and synthetic media.  
*Chemosphere*, **41**, 437-446.
- Wilson, A. D. et Baietto, M. (2009)**  
Applications and Advances in Electronic-Nose Technologies.  
*sensors*, **9**, 5099-5148.
- Wilson, D. M., Dunman, K., Roppel, T. et Kalim, R. (2000)**  
Rank extraction in tin-oxide sensor arrays.  
*Sensors and Actuators B: Chemical*, **62** (3), 199-210.
- Wohltjen, H. et Dessy, R. (1979)**  
Surface acoustic wave probe for chemical analysis. I. Introduction and instrument description.  
*Analytical chemistry*, **51** (9), 1458.
- Wolfrum, E. J., Meglen, R. M., Peterson, D. et Sluiter, J. (2006)**  
Metal oxide sensor arrays for the detection, differentiation, and quantification of volatile organic compounds at sub-parts-per-million concentration levels.  
*Sensors and Actuators B: Chemical*, **115** (1), 322-329.

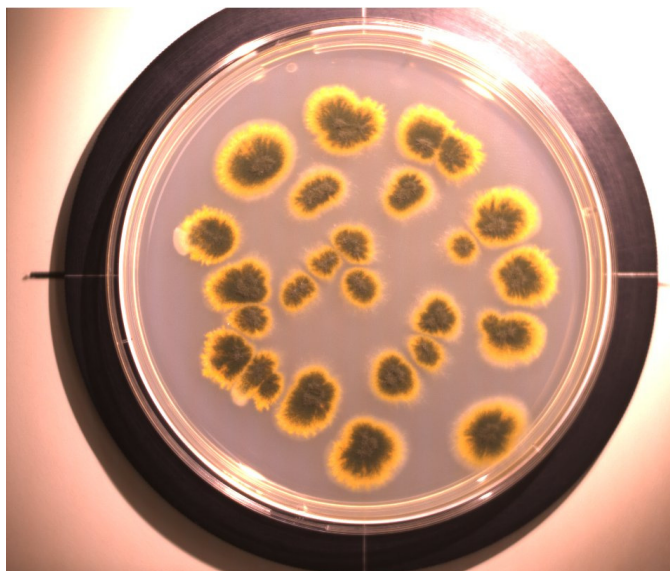


- Wouters, I. M., Douwes, J., Doekes, G., Thorne, P. S., Brunekreef, B. et Heederik, D. J. J. (2000)**  
Increased levels of markers of microbial exposure in homes with indoor storage of organic household waste.  
*Applied and Environmental Microbiology*, **66** (2), 627-631.
- Xie, H., Yang, Q., Sun, X., Yang, J. et Huang, Y. (2006)**  
Gas sensor arrays based on polymer-carbon black to detect organic vapors at low concentration.  
*Sensors and Actuators B: Chemical*, **113** (2), 887-891.
- Xu, B. et Vermeulen, N. P. E. (1988)**  
Preparation of wall-coated open-tubular capillary columns for gas chromatography.  
*Journal of Chromatography A*, **445**, 1.
- Yamazoe, N. et Shimanoe, K. (2007)**  
Overview of gas sensor technology.  
*In: Science and technology of chemiresistor gas sensors*, Aswal, D. K. et Gupta, S. K., Nova, New york, p. 1-33.
- Yan, H. M., Kraus, G. et Gauglitz, G. (1995)**  
Detection of mixtures of organic pollutants in water by polymer film receptors in fibre-optical sensors based on reflectometric interference spectrometry.  
*Analytica Chimica Acta*, **312** (1), 1-8.
- Yang, C. S. et Johanning, E. (1997)**  
Airborne fungi and mycotoxins.  
*Manuel of Environmental Microbiology*, 651-660.
- Yi, J. W., Shih, W. Y. et Shih, W.-H. (2002)**  
Effect of length, width, and mode on the mass detection sensitivity of piezoelectric unimorph cantilevers.  
*Journal of applied physics*, **91** (3), 1680-1686.
- Zampolli, S., Elmi, I., Sturmman, J., Nicoletti, S., Dori, L. et Cardinali, G. C. (2005)**  
Selectivity enhancement of metal oxide gas sensors using a micromachined gas chromatographic column.  
*Sensors and Actuators B: Chemical*, **105** (2), 400-406.
- Zdanevitch, I. (2000)**  
Veille technologique capteurs de gaz.  
*Laboratoire Central de Surveillance de la Qualité de l'Air (LCSQA) - INERIS*, 1-53.
- Zellers, E. T., Reidy, S. M., Veeneman, R. A., Gordenker, R., Steinecker, W. H., Lambertus, G. R., Kim, H., Potkay, J. A., Rowe, M. P., Zhong, Q., Avery, C., Chan, H. K. L., Sacks, R. D., Najafi, K. et Wise, K. D. (2007)**  
An integrated micro-analytical system for complex vapor mixtures.  
*In: The 14th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems*, Lyon, France, **2**, 1491-1496.
- Zellers, E. T., Steinecker, W. H., Lambertus, G. R., Agah, M., Lu, C.-J., Chan, H. K. L., Potkay, J. A., Oborny, M. C., Nichols, J. M., Astle, A. A., Kim, H. S., Rowe, M. P., Kim, J., da Silva, L. W., Zheng, J., Whiting, J. J., Sacks, R. D., Pang, S. W., Kaviany, M., Bergstrom, P. L., Matzger, A. J., Kurdak, C., Bernal, L. P., Najafi, K. et Wise, K. D. (2004)**  
A versatile MEMS gas chromatograph for determinations of environmental vapor mixtures.  
*In: Solid-State Sensor, Actuator, and Microsystems Workshop*, Hilton Head Island, South Carolina, 61-66.

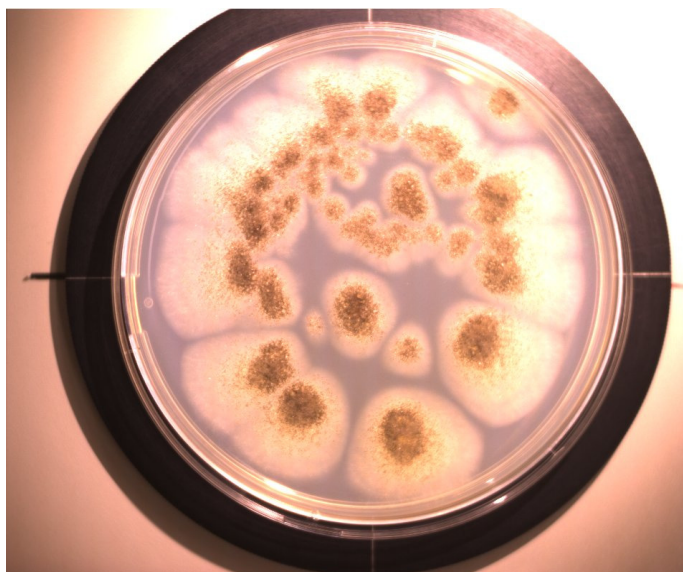
## ANNEXES

### ANNEXE I : PHOTOGRAPHIES DES SOUCHES DE L'ETUDE CULTIVANT SUR MILIEU S10 (APRES 7 JOURS D'INCUBATION A 25°C)

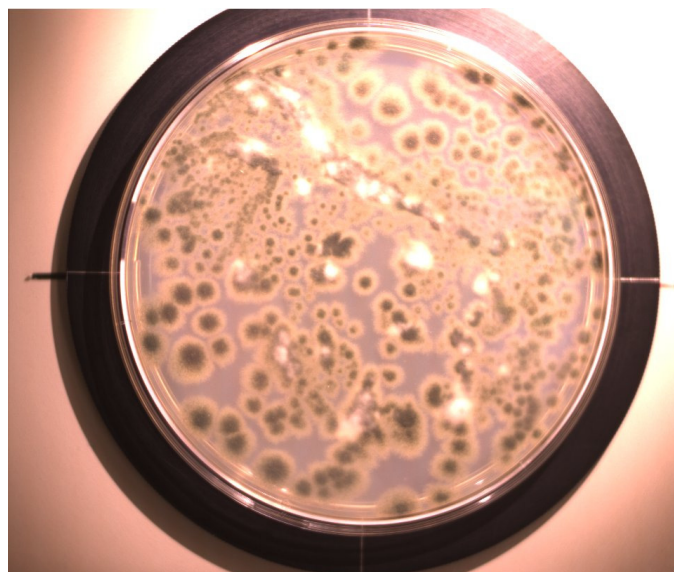
Souches isolées sur le lin



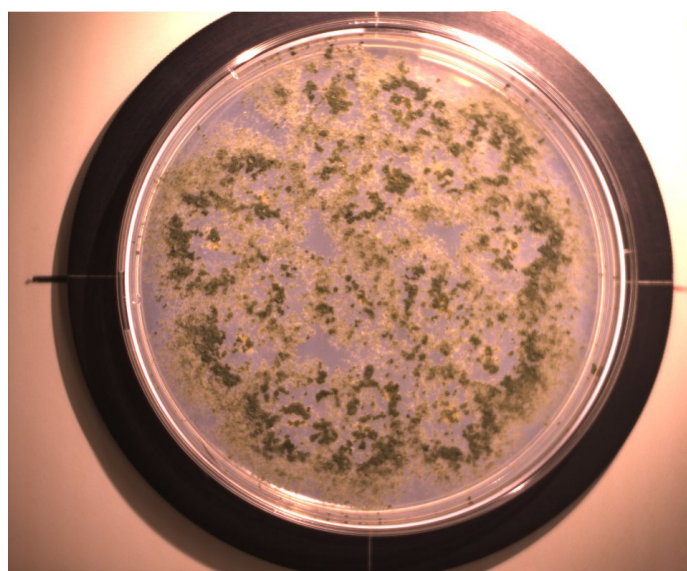
*Aspergillus sydowii*



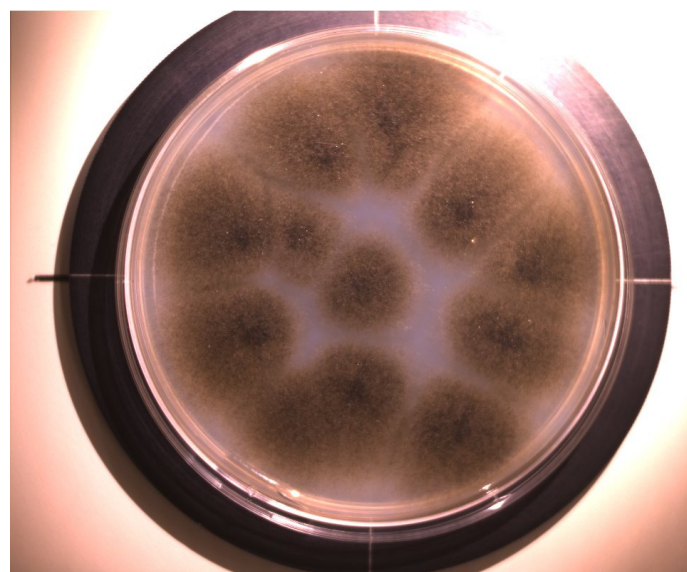
*Penicillium solitum*



*Penicillium brevicompactum*

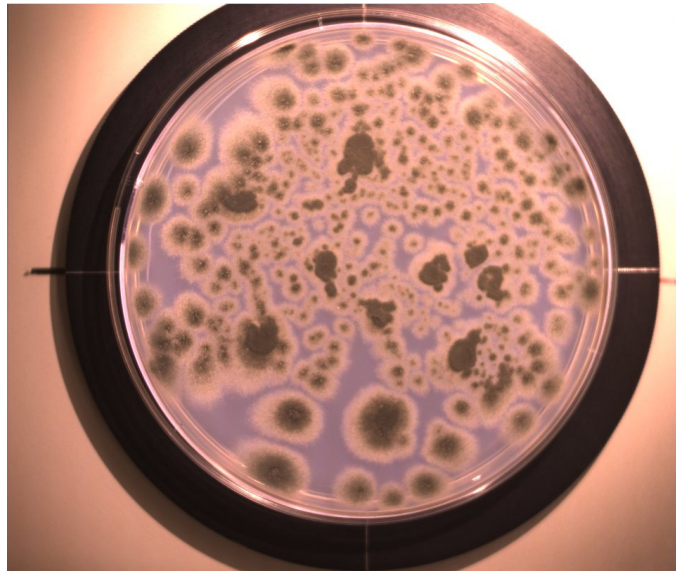


*Trichoderma komingii*

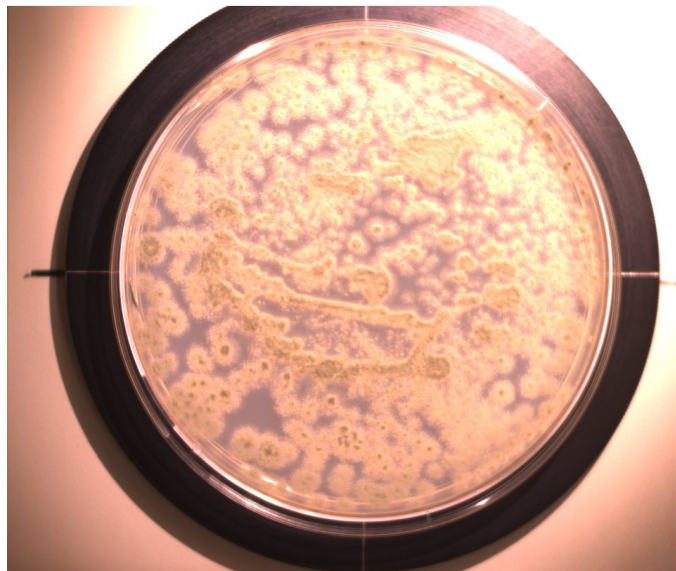


*Ulocladium alternariae*

Souches isolées sur la colle peau de lapin



*Penicillium brevicompactum*



*Penicillium corylophilum*



## ANNEXE II : PROTOCOLE DE CONTAMINATION – IDENTIFICATION DES COV

**Matériel :**

- 12 chambres de 300 mL
- billes de verre
- matériau de référence inerte:
  - fibre de verre (2 cm × 5 cm), compter 3 morceaux par chambre
- matériau de support spécifique de l'espèce:
  - lin (2 cm × 5 cm), compter 3 morceaux par chambre
  - colle peau de lapin / argile (50 mL)
  - le bois (hêtre), 1 morceau (2,5 cm × 1,5 cm × 5 cm)
- 8 moisissures et 1 basidiomycète repiqués sur avoine
- eau ultra pure

Les matériaux stérilisés à 121°C pendant 45 min à chaleur humide avant utilisation. Les chambres et les billes de verre sont également stérilisées. Toutes les manipulations sont réalisées sous hotte à flux laminaire.

**1) Préparation de la suspension de spores (à faire pour chaque moisissure)**

Verser de l'eau ultra pure sur la moisissure repiquée sur avoine puis récupérer la suspension de spores dans 50 mL.

**2) Préparation de la solution nutritive**

Composition de la solution nutritive :

$K_2HPO_4$  : 1g - KCl : 0,5g -  $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$  : 0,5g -  $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$  : 0,01 g – Glucose : 31,5 g –  $NaNO_3$  :  $3,5 \cdot 10^{-2}$  g/L – 1L de solution tamponnée en pH

Préparation de la solution tampon pH = 7,4 :

250mL de  $KH_2PO_4$  à 0,1 M + 145,5 mL de NaOH à 0,1 M, compléter à 500 mL avec de l'eau distillée.

**3) Préparation des solutions**

Solution A : « suspension de spores + solution nutritive »

- Faire un mélange 50/50 v/v suspension de spores (20 mL) / solution nutritive (20 mL).

Solution B : « eau ultrapure + solution nutritive »

- Faire un mélange 50/50 v/v eau ultrapure (20 mL) / solution nutritive (20 mL).

**4) Préparation des chambres**

- Pour la fibre de verre, le lin et le bois :

Dans une chambre dont les vannes sont fermées, déposer 50 mL de billes de verre, 5 mL d'eau ultra pure sur les billes, puis disposer le matériau sur les billes.

- Pour l'argile :

Dans une chambre dont les vannes sont fermées, verser 50 mL du matériau dans le fond de la chambre, puis 5 mL d'eau ultra pure.

- Pour la colle peau de lapin (disponible sous forme de granule):

La colle additionnée à 5 mL d'eau ultra pure est chauffée au bain-marie. Dans une chambre dont les vannes sont fermées, verser 50 mL du matériau sous forme liquide dans le fond de la chambre.

### **5) Conditionnement des chambres**

- Pour les chambres contaminées :

Verser sur ce matériau 5 mL de la solution A. Fermer la chambre et ouvrir les vannes pour faire passer de l'air filtré sur charbon actif (élimination de COV présents avant le début de la croissance) pendant 30 min. Placer la chambre à l'étuve durant 7 jours à 25°C et à l'obscurité.

- Pour les chambres témoins :

Verser sur le matériau 5 mL de la solution B. Fermer la chambre et ouvrir les vannes pour faire passer de l'air filtré sur charbon actif (élimination de COV présents avant le début de la croissance) pendant 30 min. Placer la chambre à l'étuve durant 7 jours à 25°C et à l'obscurité.

## ANNEXE III : IDENTIFICATION DES COMPOSES DU METABOLISME FONGIQUE

Identification des composés du métabolisme fongique issus du lin contaminé par *Aspergillus sydowii*, *Penicillium solitum*, *Penicillium brevicompactum*, *Trichoderma komingii* et *Ulocladium alternariae*

Composés	<i>Aspergillus sydowii</i>		<i>Penicillium solitum</i>		<i>Penicillium brevicompactum</i>		<i>Trichoderma komingii</i>		<i>Ulocladium alternariae</i>	
	FV	Lin	FV	Lin	FV	Lin	FV	Lin	FV	Lin
3-méthyl-2-butanone						+				
3-butyn-1-ol				+						
4-méthyl-1-heptène				+		+				
tétrahydro-2,2,5,5-tétraméthylfurane				+		+				
2-éthyl-2-hexenal										+
1-octèn-3-one				+						
1,3-octadiène	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1-octèn-3-ol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
α-pinène	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3-méthyl-1-butanol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2-méthyl-1-butanol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2-méthylfurane	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3-méthylfurane	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4-méthyl-2-hexanone			+	+						
1,3,6-heptadiène								+		
4-heptanone			+	+	+			+		
2-méthyl-éthylhexanoate	+		+							
terpinolène			+							

Identification des composés du métabolisme fongique issus de la colle peau de lapin contaminé par *Penicillium brevicompactum* et *Penicillium corylophilum*

Composés	<i>Penicillium brevicompactum</i>		<i>Penicillium corylophilum</i>	
	FV	Colle PDL	FV	Colle PDL
Méthyl-2-méthylbutanoate		+		+
1,3-octadiène	+	+	+	+
1-octèn-3-ol	+	+	+	+
Diméthyldisulfide	+	+	+	+
2-méthylfurane	+	+	+	+
3-méthylfurane	+	+	+	+
3-méthyl-1-butanol	+	+	+	+
2-méthyl-1-butanol	+	+	+	+
α-pinène	+	+	+	+
4-heptanone	+			
1,4-heptadiène			+	
2-éthylfurane			+	
Méthyl-2-éthyl-3-hydroxyhexanoate	+		+	
Ethyl-2-méthylpropanoate	+		+	
Méthyl-1-méthylbutanoate	+		+	
Ethyl-2-méthylbutanoate	+		+	
Ethyl-3-méthylbutanoate	+		+	

Identification des composés du métabolisme fongique issus de l'argile de Lascaux contaminé par *Fusarium solani*

Composés	<i>Fusarium solani</i>	
	FV	Argile Lascaux
1,3,5-heptatriène		+
3-hexanone		+
2-pental		+
4-méthyl-4-hexène-3-one		+
2-éthylhexanal		+
2-méthyl-1-butanol	+	+
2-méthylfurane	+	+
1,3-octadiène	+	+
4-heptanone	+	+
1-octène-3-ol	+	+
méthyl-2-éthylhexanoate	+	+
3-méthylfurane	+	

Identification des composés du métabolisme fongique issus de l'hêtre contaminé par *Phellinus megaloporus*

Composés	<i>Phellinus megaloporus</i>	
	FV	Hêtre
méthyléthanoate		+
3-méthyl-2-butanone		+
2,5-diméthylfurane		+
3-hexanone		+
1,3-pentadiène	+	+
2-méthylfurane	+	+
2-pentanone	+	+
3-méthyl-2-butanol	+	+
3-méthyl-1-butanol	+	+
2-méthyl-1-butanol	+	+
diméthylsulfide	+	+



## ANNEXE IV : INTRODUCTION A LA CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

**PRINCIPE ET DEFINITION**

La chromatographie en phase gazeuse (CPG), est une méthode d'analyse par séparation qui s'applique aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition. Elle permet ainsi l'analyse de mélanges éventuellement de natures très complexes et de volatilités très diverses.

Le cœur d'un système de chromatographie est la **colonne**, qui est un tube plus ou moins perméable aux gaz qui renferme une substance active, solide ou liquide, appelée **phase stationnaire**. La phase stationnaire peut-être disposée dans la colonne de deux façons complètement différentes qui caractérisent les colonnes dites « **remplies** » et les colonnes « **capillaires** ». Jusqu'au début des années 90, les colonnes les plus utilisées étaient les colonnes remplies. Les colonnes sont dites remplies lorsque la phase est un solide finement morcelé sous forme de granulés poreux. Ces colonnes sont le plus souvent en métal, de 2 à 4mm de diamètre intérieur et de 1 à 6 m de longueur. Le diamètre des grains est généralement compris entre 0,1 et 0,2 mm.

Les colonnes capillaires, sont des tubes vides, aujourd'hui le plus souvent en silice fondue, à l'intérieur desquels la phase stationnaire est déposée, sur la paroi interne, sous la forme d'un film aussi régulier que possible. Leur diamètre intérieur est généralement compris entre 0,1 et 0,6mm, leur longueur entre 10 et 100 m, et l'épaisseur du film varie entre 0,1 et 5  $\mu\text{m}$ . L'avantage essentiel sur les colonnes remplies est de conduire à des séparations plus poussées dans le cas des mélanges complexes de produits physiquement voisins et permettent des analyses très rapides pour les colonnes relativement courtes.

Le processus chromatographique est discontinu. L'échantillon gazeux à analyser, est injecté dans la colonne et est ensuite transporté à travers la colonne par un **gaz vecteur** inerte (hélium He, azote N<sub>2</sub>) appelé **phase mobile**. Les molécules vont ainsi parcourir la colonne avec un temps de rétention proportionnel aux propriétés intrinsèques des différentes molécules (point d'ébullition, fonction chimique, taille, masse, structure...) et à leurs affinités avec la phase stationnaire (polarité...).

Les molécules vont donc sortir progressivement de la colonne pour être détectées par différentes méthodes de détection existantes (Serpinet, 1995a).

Les bancs d'analyse utilisés dans les laboratoires se composent généralement, du système injectant le gaz vecteur inerte permettant l'évolution des molécules à travers la colonne, d'un injecteur qui permet d'introduire et de rendre volatil l'échantillon dans la colonne, de la colonne insérée à l'intérieur d'un four permettant la régulation de la température, du détecteur permettant la détection, la quantification et l'identification des molécules et enfin de l'enregistreur qui transcrit généralement sous forme de chromatogramme les données transmises par le détecteur. La Figure IV-24 présente le principe de fonctionnement d'un banc d'analyse chromatographique.

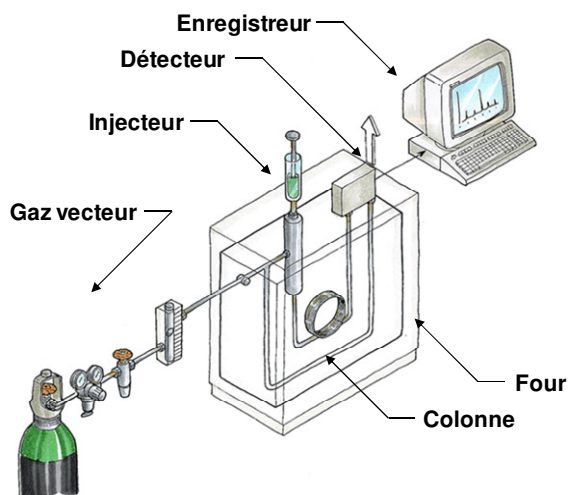
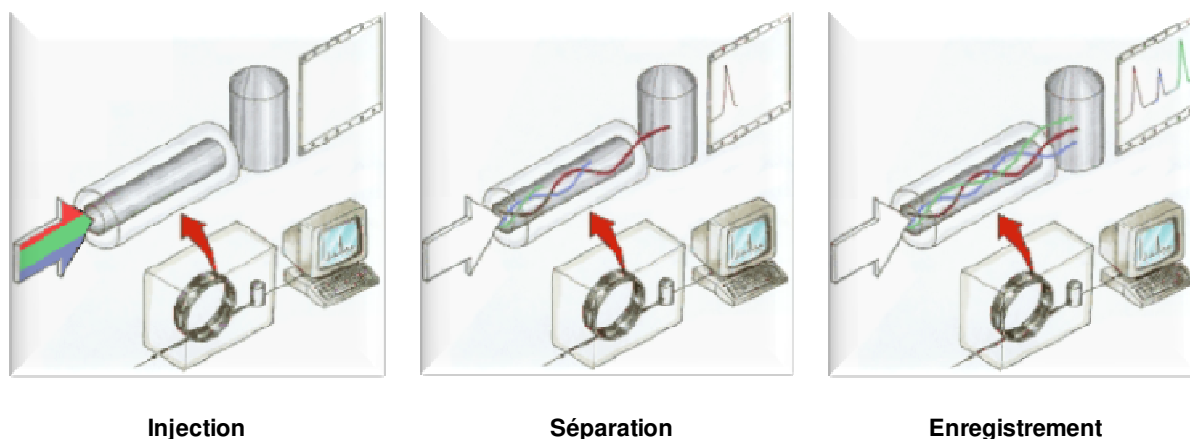


Figure IV-24 : Principe d'un banc d'analyse par chromatographie

Le principe de séparation des molécules à travers le banc d'analyse peut donc se résumer en trois étapes. La première consiste à injecter tout l'échantillon dans la colonne, les molécules sont ensuite transportées et séparées à travers la colonne à différentes vitesses suivant leurs temps de rétention propre avec la phase de la colonne et sont détectées et enregistrées en sortie de colonne sous forme généralement de chromatogramme (ensemble de pics) qui seront ensuite interprétés (Figure IV-25) :



Injection

Séparation

Enregistrement

Figure IV-25 : Séparation des molécules par leurs temps de rétention

## FONDEMENTS THEORIQUES

Dans le livre de J. Tranchant, *Chromatographie en phase gazeuse*, Serpinet explique de manière détaillée les apports de la théorie sur la séparation chromatographique (Serpinet, 1995b). Aussi, une approche simplifiée des paramètres de **rétention chromatographique** et d'**efficacité de séparation** sont présentés dans ce paragraphe.

En présence de toute séparation imparfaite de deux composés (Figure IV-26.a), deux démarches sont concevables, la première revient à éloigner les pics l'un de l'autre (Figure IV-26.b : phénomène de rétention chromatographique), la seconde démarche consiste à rendre chacun des pics plus étroits (Figure IV-26.c : efficacité de la colonne).

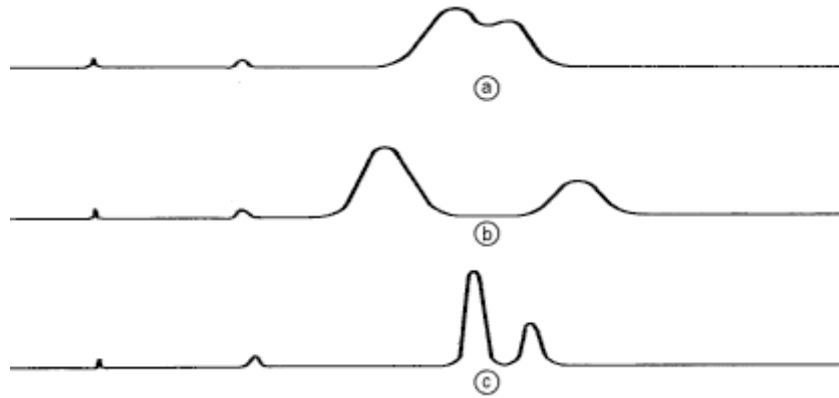


Figure IV-26 : a. Pics mal séparés. b. Pics séparés par changement de la phase stationnaire. c. Pics séparés par l'emploi d'une colonne plus efficace (Serpinet, 1995b)

Le **temps de rétention**  $t_R$ , est le temps qui s'écoule entre l'injection de l'échantillon et l'apparition du sommet du pic du composé considéré. Ce paramètre dépend du couple composé-phase stationnaire, de l'étendue des volumes vides de la colonne (mais aussi en pratique des volumes mort de l'injecteur, du détecteur et des jonctions), du débit du gaz vecteur, de la masse de la phase stationnaire dans la colonne et de la température de la colonne. En revanche, le temps de rétention est indépendant de la quantité injectée (tant que celle-ci est faible), de la nature et de l'abondance des autres constituants s'ils sont bien séparés, de la nature du gaz vecteur, et de la pression du gaz vecteur.

Le temps de rétention est d'autant plus court que le débit volumique du gaz vecteur est grand. Le produit de  $t_R$  par le débit  $D$  est une constante  $V_R$  appelé **volume de rétention**. Le volume de rétention décroît rapidement quand la température s'élève, c'est la raison pour laquelle la température de la colonne doit faire l'objet d'une régulation soignée si on veut obtenir des chromatogrammes reproductibles et de bonnes analyses.

L'**efficacité de séparation** à température constante est l'aptitude de la colonne et des conditions dans lesquelles elle est employée, à donner des pics étroits favorables aux séparations. L'efficacité de la colonne dépend de la nature de celle-ci (capillaire ou remplie), de sa qualité de préparation et de son emploi.

Un pic chromatographique est une distribution statistique des temps de transit des molécules à travers la colonne. Celles-ci émergent en effet au bout de temps différents qui correspondent aux points du pic, l'abondance des arrivées à chaque instant étant matérialisée par la hauteur au-dessus de la ligne de base. Cette distribution est donc caractérisée par une moyenne qui est le temps de rétention et par une variance  $\sigma^2$  qui est liée à l'étalement des arrivées des molécules.

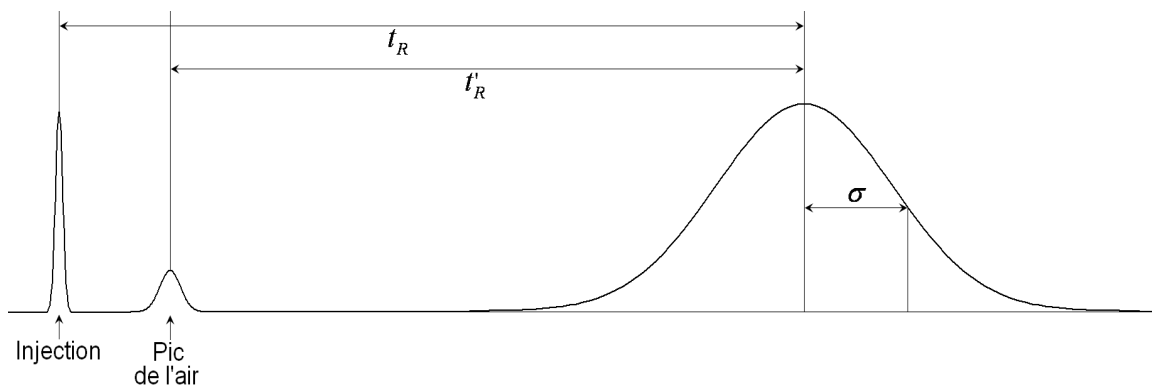


Figure IV-27 : Paramètres expérimentaux d'un pic chromatographique supposé gaussien (Serpinet, 1995b)

Pour caractériser l'efficacité de séparation une grandeur est donc définie et exprimée en « nombre de plateaux théoriques » :

$$N = \left( \frac{t_R}{\sigma} \right)^2$$

La « hauteur équivalente à un plateau théorique » (HEPT) est donnée par la formule :

$$h = \left( \frac{L_C}{N} \right)$$

Où  $L_C$  est la longueur de la colonne.

Cette grandeur est souvent utilisée pour évaluer l'efficacité d'une colonne chromatographique. Une colonne chromatographique est d'autant plus efficace que son nombre de plateaux théorique est élevé et que, par conséquent, sa HEPT est faible. En effet,  $h$  et/ou  $N$  caractérisent le fonctionnement de la colonne car ils dépendent non seulement de la nature de la phase stationnaire et de la géométrie de la colonne, mais également de tous les autres facteurs qui influencent les équilibres mis en jeu lors du phénomène de séparation (température de la colonne, débit du gaz vecteur...).  $h$  et/ou  $N$  sont donc des paramètres extrinsèques de la colonne chromatographique (Sanchez, 2005).

La vitesse linéaire, liée au débit du gaz vecteur, est le principal paramètre physique à la disposition de l'expérimentateur pour modifier la cinétique de la chromatographie. C'est en privilégiant ce paramètre qu'ont été développées les grandes équations cinétiques de la chromatographie.

L'équation qui décrit l'influence de la vitesse moyenne du gaz vecteur sur la HEPT a été proposée par Golay (Golay, 1958), postérieurement à l'équation correspondante due à Van Deemter *et al.* pour les colonnes remplies (van Deemter *et al.*, 1956) :

$$h = \frac{B}{\bar{u}} + C_G \bar{u} + C_L \bar{u}$$

Où  $\bar{u}$  est la vitesse linéaire moyenne du gaz vecteur.  $B$ ,  $C_G$  et  $C_L$  sont des constantes données par les équations :

$$B = 2D_G$$

$$C_G = \frac{r^2}{D_G} \times \frac{1 + 6k' + 11k'^2}{24(1 + k')^2}$$

$$C_L = \frac{e_f^2}{D_L} \times \frac{2k'}{3(1 + k')^2}$$

Où  $r$  est le rayon interne de la colonne,  $k'$  le facteur de capacité,  $D_G$  le coefficient de diffusion moléculaire du composé dans le gaz vecteur,  $D_L$  le coefficient de diffusion moléculaire du composé dans la phase stationnaire,  $e_f$  est l'épaisseur du film de phase stationnaire.

La courbe représentative  $h = f(\bar{u})$  est une hyperbole dont la Figure IV-28 met en évidence les éléments principaux.

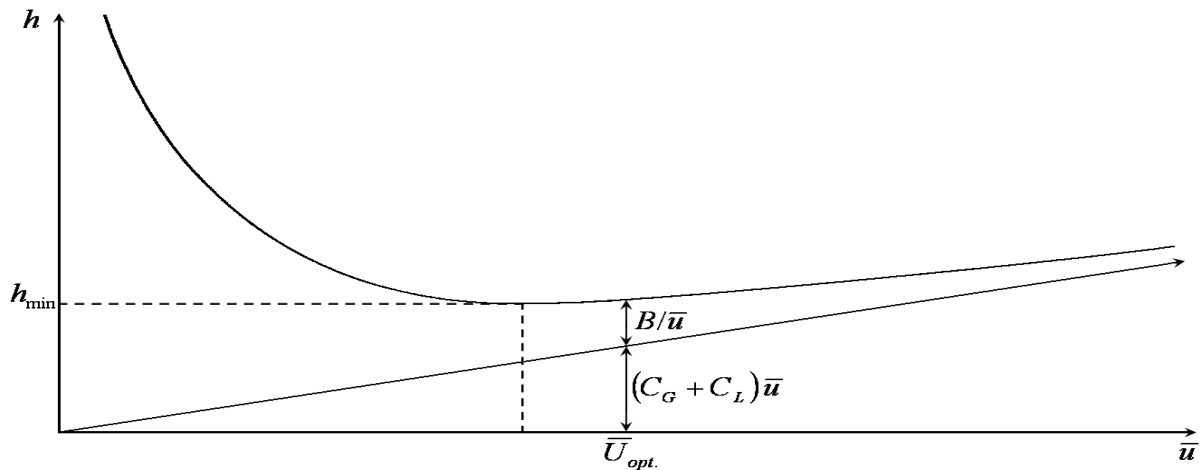


Figure IV-28 : Courbe représentative de l'équation de Golay

Le point essentiel est l'existence d'un minimum de  $h$  qui correspond à une vitesse optimale du gaz vecteur, donc à un débit optimal du gaz pour l'efficacité de la colonne. L'optimum de débit est un compromis entre les vitesses trop faibles qui accroissent la contribution de la diffusion longitudinale ( $B / \bar{u}$ ) et les vitesses trop fortes qui accroissent le poids des résistances au transfert de matière, particulièrement en phase gazeuse ( $C_L \cdot \bar{u}$  et  $C_G \cdot \bar{u}$ ).

Les gaz porteurs légers comme l'hélium, ou mieux encore hydrogène sont préférables, non pour des raisons d'efficacité, mais de rapidité. En effet, dans une colonne capillaire, le minimum de  $h$  est atteint pour des valeurs plus élevées de  $\bar{u}$ . L'utilisation de l'air comme gaz vecteur élimine les inconvénients de stockage de gaz et facilite la miniaturisation. Cependant, l'air a une viscosité plus haute et une constante de diffusion plus faible que les gaz vecteur conventionnel comme l'hydrogène, ce qui diminue la vitesse linéaire du gaz vecteur et l'efficacité de la colonne (Potkay *et al.*, 2006)

L'efficacité maximale ne dépend que du diamètre de la colonne et du facteur de capacité du composé. Par ailleurs, en ce qui concerne les colonnes capillaires,  $h_{min}$  étant proportionnel au diamètre, à longueur égale, l'efficacité sera meilleure pour un diamètre plus petit. Il est également important de préciser le fait que la géométrie de la section interne de la colonne n'a aucune influence sur l'allure de la représentation graphique (Golay, 1958).

Pour faciliter la compréhension, un nouveau facteur peut être introduit qui représente le degré de séparation entre deux composés. Ce facteur, qui permet également de décrire l'efficacité d'une colonne chromatographique se nomme « *facteur de séparation* » :

$$S = \frac{L_C}{h} \cdot \left( \frac{k'}{k' + 1} \right)^2$$

Où  $h$  est la HEPT,  $L_C$  la longueur de la colonne, et  $k'$  le rapport de partition.

Dans son étude, Sanchez montre qu'il est possible d'exprimer  $h$  en fonction du rayon interne de la colonne et donc d'observer l'évolution du facteur de séparation en fonction du rayon interne pour différentes valeurs de pressions imposées en entrée de colonne ou pour différentes longueurs de colonne (Sanchez, 2005). En fixant les paramètres expérimentaux ( $D_G$ ,  $D_L$ , le coefficient de partition  $c$ ,  $k'$ ) et dans un cas, la longueur, dans l'autre cas, la pression, des représentations graphiques traduisent l'influence de la pression ou de la longueur sur l'efficacité du système.

Pour chaque valeur de pression interne de la colonne, il existe une valeur de rayon interne qui maximise la valeur du facteur de séparation. Pour des valeurs plus élevées en pression, le

maximum de  $S$  est obtenu pour des rayons plus petits. De plus, la valeur du facteur de séparation augmente pour des pressions plus grandes.

Une analyse de l'influence de la longueur de la colonne sur l'efficacité de séparation montre que le facteur de séparation augmente avec la longueur et qu'un maximum de  $S$  est obtenu pour des rayons plus grands.

## DETECTION ET IDENTIFICATION

### *DETECTION DES MOLECULES*

La *détection par ionisation de flamme* (FID) est une technique de détection très utilisée généralement couplée à un spectromètre de masse. En sortie de la colonne, l'échantillon traverse une flamme (combustion avec de l'hydrogène et de l'air) et les composés organiques forment alors des ions. Ces ions sont alors collectés par deux électrodes entre lesquelles une différence de potentiel est maintenue et produisent alors un signal électrique mesurable.

Un *détecteur à conductivité thermique* (catharomètre) repose sur la mesure de variation d'une résistance sensible à la température. La résistance est en équilibre thermique lorsque le refroidissement provoqué par le passage du gaz vecteur de la colonne, compense le réchauffement provoqué par le courant électrique qui la traverse. Cet équilibre est rompu lors du passage en sortie de la colonne des molécules entraînées par le gaz vecteur (conductivité thermique différente de celle du gaz vecteur seul), qui modifie la capacité de refroidissement et entraîne donc une variation de résistance.

La stratégie de mesure consiste généralement à placer deux résistances sensibles à la température en opposition dans un pont de Wheatstone. Ce pont est maintenu à l'équilibre avec deux résistances sensibles traversées par le gaz vecteur. Seulement une des deux résistances va être exposée au gaz vecteur qui sort de la colonne, l'autre servira de référence. Le passage des molécules entraînera le déséquilibre du pont qui générera un signal mesurable.

### *IDENTIFICATION DES MOLECULES*

La chromatographie en phase gazeuse est généralement couplée avec la *spectrométrie de masse* (mass spectrometry ou MS) pour la séparation et l'identification des composés. La spectrométrie de masse est une technique physique d'analyse permettant de détecter et d'identifier des molécules d'intérêt par mesure de leur masse. La spectrométrie de masse permet de caractériser la structure chimique des molécules en les fragmentant. Son principe réside dans la séparation en phase gazeuse de molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/charge ( $m/z$ ). Cette technique est la plus utilisée pour l'identification des COV (Schnürer *et al.*, 1999; Koester et Moulik, 2005; Pejcic *et al.*, 2007).

La *spectrométrie infrarouge* consiste en la mesure de la longueur d'ondes et de l'intensité de la lumière infrarouge moyenne pour un échantillon. Un spectrophotomètre infrarouge est un instrument qui fait passer de la lumière infrarouge à travers des molécules organiques dont les longueurs d'ondes des bandes d'absorption infrarouges sont caractéristiques des types particuliers de liaisons chimiques. Cette méthode implique l'examen des mouvements de torsion, de courbure, de rotation et de vibration des atomes dans une molécule. Le spectromètre produit alors un spectre avec en abscisse la longueur d'onde de radiation infrarouge et le pourcentage de lumière transmise en ordonnée. La spectrométrie infrarouge trouve sa plus grande utilité dans l'identification des molécules organiques et organométalliques.

## ANNEXE V : PROTOCOLE D'INJECTION DE TRACEURS DANS LES CHAMBRES

**II.1 Saturation d'humidité****Matériel :**

- 4 chambres de 300 mL
- billes de verre
- un matériau témoin inerte non émissif: fibre de verre (2 cm × 5 cm), compter 3 morceaux par chambre
- 8 tubes TENAX
- 3 seringues de 1 mL
- 3 traceurs : 1-octèn-3-ol ; 2-méthyl-1-butanol ; 2-méthylfurane
- 140 mL d'eau ultra pure

Les matériaux sont découpés (2 X 5cm) puis stérilisés (121°C, 45 min, chaleur humide) avant utilisation. Les chambres et les billes de verre sont également stérilisées.

**1) Préparation d'une chambre témoin (fibre de verre seule sans traceur)**

Dans une chambre dont les vannes sont fermées déposer 50 mL de billes de verre, 5 mL d'eau ultra pure sur les billes, puis disposer le matériau sur les billes. Puis introduire des tubes TENAX TA à chaque extrémité des vannes, ouvrir les vannes, faire passer de l'air filtré sur charbon actif pendant 30 min. Fermer les vannes, arrêter le passage d'air filtré, enlever les tubes TENAX TA et placer la chambre à l'étuve durant 1 nuit à 25°C et à l'obscurité.

**2) Préparation de 3 chambres contaminées (fibre de verre seule avec chacun des 3 traceurs)**

Dans une chambre dont les vannes sont fermées déposer 50 mL de billes de verre, 5 mL d'eau ultra pure sur ces billes, puis la fibre de verre. Puis introduire des tubes TENAX TA à chaque extrémité des vannes, ouvrir les vannes, faire passer de l'air filtré sur charbon actif pendant 30 min. Fermer les vannes, placer un septum à l'une des extrémités, ouvrir la vanne et introduire via la seringue 0,3 mL de traceur. Fermer la vanne et placer la chambre à l'étuve durant 1 nuit à 25°C et à l'obscurité.

## **II.2 Sans humidité**

### **Matériel :**

- 4 chambres de 300 mL
- 8 tubes TENAX
- 3 seringues de 1 mL
- 3 traceurs : 1-octèn-3-ol ; 2-méthyl-1-butanol ; 2-méthylfurane

Les chambres sont stérilisées (121°C, 45 min, chaleur humide) avant utilisation.

### **1) Préparation d'une chambre témoin**

Dans une chambre, introduire des tubes TENAX à chaque extrémité des vannes, ouvrir les vannes, faire passer de l'air filtré sur charbon actif pendant 30 min. Fermer les vannes, arrêter le passage d'air filtré, enlever les tubes TENAX et placer la chambre à l'étuve durant 1 nuit à 25°C et à l'obscurité.

### **2) Préparation de 3 chambres contaminées**

Dans une chambre, introduire des tubes TENAX TA à chaque extrémité des vannes, ouvrir les vannes, faire passer de l'air filtré sur charbon actif pendant 30 min. Fermer les vannes, placer un septum à l'une des extrémités, ouvrir la vanne et introduire via la seringue 0,3 mL de traceur. Fermer la vanne et placer la chambre à l'étuve durant 1 nuit à 25°C et à l'obscurité.



## ANNEXE VI : PROTOCOLE DE CONTAMINATION – DETECTION DES COV

**Matériel :**

- 14 chambres de 300 mL
- billes de verre
- un matériau témoin inerte vis-à-vis des moisissures: fibre de verre (2 cm × 5 cm), compter 3 morceaux par chambre
- un matériau spécifique de la dégradation du bois fibreux: morceau d'hêtre (1,5 cm × 1.2 cm × 5 cm), 1 morceau par chambre
- 6 moisissures et 1 basidiomycète repiqués sur avoine :
  - 2 représentatives de l'habitat : *Aspergillus versicolor*, *Penicillium brevicompactum*
  - 2 représentatives des musées : *Penicillium solitum*, *Penicillium corylophilum*
  - 1 représentative des environnements intérieurs en général : *Aspergillus niger*
  - 1 représentative de la grotte de Lascaux : *Fusarium solani*
  - 1 basidiomycète représentatif du bois : *Phellinus megaloporus*
- eau ultra pure

Les matériaux stérilisés à 121°C pendant 45 min à chaleur humide avant utilisation. Les chambres et les billes de verre sont également stérilisées. Toutes les manipulations sont réalisées sous hotte à flux laminaire.

**1) Préparation de la suspension de spores (à faire pour chaque moisissure)**

Verser de l'eau ultra pure sur la moisissure repiquée sur avoine puis récupérer la suspension de spores dans 50 mL.

**2) Préparation de la solution nutritive**

Composition de la solution nutritive :

$K_2HPO_4$  : 1g - KCl : 0,5g -  $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$  : 0,5g -  $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$  : 0,01g – Glucose : 31,5g –  $NaNO_3$  :  $3,5 \cdot 10^{-2}$  g/L – 1 L de solution tamponnée en pH

Préparation de la solution tampon pH = 7,4 :

250mL de  $KH_2PO_4$  à 0,1 M + 145,5 mL de NaOH à 0,1 M, compléter à 500 mL avec de l'eau distillée.

**3) Préparation de la solution « suspension de spores + solution nutritive »**

Solution A : « suspension de spores + solution nutritive »

- Faire un mélange 50/50 v/v suspension de spores (20 mL) / solution nutritive (20 mL).

Solution B : « eau ultrapure + solution nutritive »

- Faire un mélange 50/50 v/v eau ultrapure (20 mL) / solution nutritive (20 mL).

**4) Préparation des chambres**

Dans une chambre dont les vannes sont fermées, déposer 50 mL de billes de verre, 5 mL d'eau ultra pure sur les billes, puis disposer 3 morceaux de fibre de verre ou le morceau d'hêtre sur les billes.

### **5) Conditionnement des chambres**

➤ Pour les chambres contaminées :

Verser sur ce matériau 5 mL de la solution A. Fermer la chambre et ouvrir les vannes pour faire passer de l'air filtré sur charbon actif (élimination de COV présents avant le début de la croissance) pendant 30 min. Placer la chambre à l'étuve durant 7 jours à 25°C et à l'obscurité.

➤ Pour les chambres témoins :

Verser sur le matériau 5 mL de la solution B. Fermer la chambre et ouvrir les vannes pour faire passer de l'air filtré sur charbon actif (élimination de COV présents avant le début de la croissance) pendant 30 min. Placer la chambre à l'étuve durant 7 jours à 25°C et à l'obscurité.





## RESUME

Les champignons sont des biocontaminants courants des environnements intérieurs. De nombreuses études ont démontré leur rôle dans la dégradation des supports que ces microorganismes colonisent tels que les matériaux de construction, les ouvrages ou les œuvres d'art. De plus, ces biocontaminants sont susceptibles d'induire des allergies, des infections, des toxi-infections ou encore des irritations.

Depuis 2005, une technique de détection de la croissance fongique, basée sur la recherche de traceurs chimiques spécifiques dans l'air, et un indice de contamination fongique (ICF), ont été développés et validés au cours de différentes campagnes de mesures dans l'habitat, les bureaux, les écoles, les crèches... L'objectivation d'une croissance fongique dans un environnement s'appuie sur des prélèvements par adsorption, une analyse chromatographique au laboratoire (GC/MS) et le calcul de l'ICF.

Dans le cadre de la surveillance de la qualité microbiologique de l'air des environnements intérieurs, cette thèse a pour ambition de prolonger ces travaux en développant notamment un système de microcapteurs chimiques adapté à la mesure *in situ*.

Cette recherche repose à la fois sur la méthode de détection fongique développée au CSTB et sur l'expertise scientifique et technique de l'ESIEE en matière de miniaturisation d'instruments de mesure, grâce à l'apport des microtechnologies.

Le premier axe de cette étude a consisté à identifier expérimentalement les COV du métabolisme fongique spécifiques d'un développement sur des matériaux du patrimoine. Ces molécules ont permis de consolider l'ICF et de définir deux indices spécifiques à la problématique des sites patrimoniaux, validés dans des châteaux, musées, bibliothèques, grottes ornées...

Le second axe porte, d'une part, sur la conception et caractérisation des briques élémentaires du microsystème, à savoir un module de préconcentration (adsorption TENAX), un module de séparation (microGC) et un module de détection (capteurs polymères) et d'autre part sur les intégrations et pilotage de ces briques.

**Mots clés :** Développement fongique, indice, COV, préservation du patrimoine, qualité de l'air intérieur, microsystème d'analyse, capteurs chimiques, polymères conducteurs, chromatographie en phase gazeuse.

## ABSTRACT

*Fungi* are common microbial contaminants of indoor environments. Many studies have demonstrated their role in the partial or total degradation of materials they colonize such as building materials, or works of art. Moreover, those microbial contaminants are likely to lead to allergies, infections, poisoning or irritation.

Since 2005, a new technique based on researching specific chemical tracers in the air, was developed and validated during different measurement campaigns.

This approach is now applied to various indoor environments (houses, offices, schools, child care centers...) and allows the detection of recent and/or hidden contamination.

The purpose of this work is to study and characterize a rapid and continuous air analysing microsystem for detection of fungal contamination in closed spaces.

This study falls within the field of monitoring air microbiological quality in indoor environments. In addition to the time saved by the absence of any laboratory analysis, this system must provide a permanent monitoring of environments frequented by people, such as museums, schools, hospitals...

This research is based both on the fungal detection method developed by CSTB and on scientific and technical expertise of ESIEE: specialised in design and manufacturing of miniaturized analysis systems obtained using microtechnology.

The first step of this study was to define the compounds' nature to be detected for different cases of contamination along with the sampling strategy for the system. The second step focuses on the microstructures design and fabrication to be used in microanalytical system based on gas chromatography and the development of a miniaturised analysis system.

So the first part of the study consisted in defining specific fungal contamination tracers for heritage conservation sites. This list allowed to reinforce a fungal contamination index for indoor environments and to define two specific indexes designed for heritage conservation sites.

The validation of these different indexes allowed checking their compliance with those types of environments (castles, museums, libraries, decorated caves...) by detecting all cases of contamination, along with the control remediation of former contaminated environments.

The second part of the study enabled the design and validation of three main modules constitutive of the microanalytical system based on gas chromatography. A miniaturised analysis system based on three modules has been developed.

**Keywords:** Fungal development, index, VOC, heritage conservation, indoor air quality, micro analytical system, chemical sensors, conducting polymers, gas chromatography.