



HAL
open science

Capteurs chimiques à base de matrices synthétisées par voie sol-gel et à transduction optique pour la détection de composés organiques volatils microbiens (mCOV)

Laure Hélène Guillemot

► To cite this version:

Laure Hélène Guillemot. Capteurs chimiques à base de matrices synthétisées par voie sol-gel et à transduction optique pour la détection de composés organiques volatils microbiens (mCOV). Autre. Université Paris Sud - Paris XI, 2012. Français. NNT : 2012PA112243 . tel-00769955

HAL Id: tel-00769955

<https://theses.hal.science/tel-00769955>

Submitted on 4 Jan 2013

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

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

Thèse de Doctorat

Spécialité : Chimie Physique

Présentée par

Laure-Hélène GUILLEMOT

En vue d'obtenir le grade de Docteur en Sciences

de l'Université de Paris Sud

Capteurs chimiques à base de matrices synthétisées par voie sol-gel et à transduction optique pour la détection de composés organiques volatils microbiens (mCOV)

Soutenue le 19 Octobre 2012

M. Didier DELABOUGLISE (Professeur des universités) : Rapporteur

M. Jean-Pierre MAHY (Professeur des universités) : Président du jury

M. Pierre MARCOUX (Ingénieur chercheur) : Encadrant

M. Sylvain ORENGA (Ingénieur) : Examineur

M. Robert PANSU (Professeur des universités) : Rapporteur

Mme Thu-Hoa TRAN-THI (Directrice de recherche) : Directrice de thèse

Résumé

La détection et l'identification de bactéries pathogènes revêt une grande importance dans de nombreux domaines tels que la santé et l'industrie agroalimentaire. Dans ce contexte, les travaux de thèse s'intéressent à détection non invasive de *Salmonella* via la fraction volatile de son métabolome dont les métabolites volatils caractéristiques sont le sulfure d'hydrogène et la cadavérine. Ils illustrent également le concept de substrats osmogènes libérant des mCOV exogènes sous l'action d'enzyme spécifique d'*Escherichia coli*.

Un premier capteur colorimétrique capable de distinguer le sulfure d'hydrogène du méthanethiol a été préparé. Il s'agit d'une matrice de silicate nanoporeuse dopée avec les réactifs N,N-diméthyl-p-phénylènediamine et ions Fe^{3+} . Une bonne stabilité de l'intermédiaire réactionnel issu de ces réactifs, la quinonediimine (QD), est obtenue pour une forte concentration d'acide chlorhydrique. La réaction entre QD et 1000 ppm de sulfure d'hydrogène et de méthanethiol entraîne l'apparition respective d'une coloration verte et rouge-marron du capteur. Le capteur fluorimétrique de cadavérine, basé sur la formation d'un complexe fluorescent entre le Naphthol AS-BI déméthylé (ArOH) et la cadavérine, permet de détecter 250 ppb de cadavérine. La preuve de concept de substrats osmogènes a été illustrée avec la détection de p-nitrophénol (pNP) et de β -naphthylamine (β -NA) libérés en présence d'enzymes de *E. coli*, β -D-glucuronidase et L-alanine- β -naphthylamidase. Les capteurs nanoporeux produits, de taille de pores contrôlée, peuvent détecter 100 ppm de pNP, composé coloré (jaune) et 100 ppm de β -NA, composé fluorescent, ou encore 100 ppm de β -NA par dérivation chimique de ce dernier avec le diméthyl-p-aminocinnamaldéhyde (formation d'un produit rouge). En milieu biologique, l'eau est un interférent majeur.

Mots clés : matrice nanoporeuse ; capteurs colorimétriques ; capteurs fluorescents ; composés organiques volatils (COV) ; *Salmonella* ; bactéries ; sulfure d'hydrogène ; méthanethiol ; cadavérine ; p-nitrophénol ; β -naphthylamine.

Abstract

Microbial contamination of food and biological samples is a big issue in the industry as much as in the medical field. In that context, the present thesis brings innovative solutions. A first explored way is the identification of *Salmonella* by detecting and measuring the specific metabolomics volatile organic compounds (mVOC) released, H_2S and cadaverine. Another new concept is the use of osmogenic substrates able to release mVOC under the action of specific enzyme of *Escherichia coli*.

A first colorimetric sensor able to discriminate H_2S from CH_3SH was produced, using a nanoporous silicate matrix doped with N,N-dimethyl-p-phenylenediamine and Fe^{3+} ions. A very acidic medium is needed to stabilize the "key" intermediate of the reaction, the quinonediimine species (QD), which gives with H_2S and CH_3SH a green and red-brown product, respectively. The fluorimetric sensor of cadaverine is based on the formation of a fluorescent complex between AS-BI demethylated Naphthol and cadaverine and can detect 250 ppb of cadaverine.

A proof of concept of osmogenic substrates is given with the detection of p-nitrophenol (pNP) et de β -naphthylamine (β -NA) released under the action of *Escherichia coli* enzymes, β -D-glucuronidase et L-alanine- β -naphthylamidase. Various nanoporous sensors are produced with tailored pore size, which can detect 100 ppm of the yellow pNP, 100 ppm of the fluorescent β -NA and 100 ppm of the red product issued from the derivation of β -NA with dimethyl-p-aminocinnamaldehyde. In biological media, water remains the major interfering agent.

Keywords: nanoporous matrix, colorimetric sensors, fluorimetric sensors, volatile organic compounds (VOC), *Salmonella*, bacteria, hydrogen sulfide, methanethiol, cadaverine, p-nitrophenol, β -naphthylamine.

Remerciements

Avant d'entamer ce manuscrit, je tiens à remercier sincèrement tous ceux qui m'ont aidé à accomplir ce projet de recherche pendant ces trois années de thèse.

Je souhaite tout d'abord remercier les membres du jury, Jean-Pierre Mahy de l'Institut de Chimie Moléculaire et des Matériaux d'Orsay (UMR 8182), Sylvain Orega de la société bioMérieux ainsi que les deux rapporteurs de cette thèse, Didier Delabouglise du Laboratoire des Matériaux et du Génie Physique (UMR 5628) et Robert Pansu du Laboratoire Photophysique et Photochimie Supramoléculaires et Macromoléculaires (UMR 8537) pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Cette thèse s'est déroulée entre le Laboratoire Francis Perrin au CEA-Saclay et le Laboratoire de Chimie des Matériaux et des Interfaces au CEA-Grenoble. C'est pourquoi je remercie Dimitra Markovitsi, directrice du Laboratoire Francis Perrin, ainsi que Cécile Reynaud, directrice du Service Photons Atomes et Molécules, pour m'avoir accueillie au sein de leur unité sur le site du CEA Saclay. Je remercie également Françoise Vinet, chef du Laboratoire de Fonctionnalisation Chimique des Microsystèmes d'avoir financé l'ensemble de la thèse. Ce laboratoire est devenu au cours de ma thèse le Laboratoire de Chimie des Matériaux et Interfaces dirigé aujourd'hui par Gilles Marchand que je tiens aussi à remercier pour l'intérêt qu'il a démontré concernant ma thématique de recherche.

Je voudrais exprimer ma gratitude à ma directrice de thèse, Thu-Hoa Tran-Thi, pour la confiance qu'elle m'a accordée et les précieux conseils qu'elle m'a prodigués tout au long de mes travaux de thèse. Chaque discussion était très enrichissante et je sortais des réunions rassérénée et optimiste. Je lui suis très reconnaissante du temps qu'elle m'a consacré notamment lors de la correction du manuscrit et ce, en dépit d'un emploi du temps surchargé.

J'adresse mes remerciements les plus sincères à mon encadrant de thèse, Pierre Marcoux. Sa grande disponibilité et sa bienveillance m'ont permis de m'approprier sereinement mon sujet de thèse. Je le remercie pour tout ce qu'il m'a appris pendant ces trois ans notamment les bases expérimentales de la microbiologie. Sa passion de la recherche, son esprit critique et sa grande créativité m'ont motivée pendant les moments de doute qui accompagnent inévitablement une thèse.

Je dois également remercier Laurent Mugherli pour l'intérêt qu'il a porté à mes travaux.

Je tiens à remercier sincèrement Pedro Deoliveira pour ses qualités de conseiller aux thèses et pour l'aide qu'il m'a apportée dans toutes les démarches demandées par l'école doctorale 470 de Paris Sud.

Ma reconnaissance va également à tous ceux qui ont contribué à l'obtention des résultats de cette thèse.

Un grand merci à Véronique Mourier et Marie Escudé qui ont facilité mon intégration en travée 105. Je remercie Marie Escudé d'avoir passé mes échantillons de RMN, de masse et d'infra-rouge. Nous avons plus que partagé notre paillasse et je la remercie pour les nombreuses conversations devant nos manip respectives.

Je tiens également à remercier Charles Rivron pour l'analyse par adsorption-désorption d'azote de mes matériaux poreux et Julien Garcia pour m'avoir aidée à préparer mon premier banc d'exposition à Saclay.

Je remercie Didier Guyader et André Fillon de l'atelier mécanique pour la fabrication du porte échantillon, Bruno Coltrani pour la préparation de cellules en quartz, Henri Gâteau pour l'usinage du porte-monolithe et de moules pour mes capteurs ainsi que Thomas Bordy et Gérard Sanchez pour l'élaboration du banc gaz à Grenoble et du système de pilotage associé.

Je suis infiniment reconnaissante envers Henri Perez pour m'avoir prêté son matériel d'électrochimie et pour sa disponibilité lorsque j'avais des interrogations. Les résultats d'électrochimie n'auraient pas été obtenus sans son aide.

Les études en résonance paramagnétique électronique ont été réalisées au laboratoire POMAM (Propriétés Optiques Magnétiques Architecturales Moléculaires, UMR 7177) par Bertrand Vilenon que je remercie vivement. Les résultats obtenus grâce à lui ont permis de comprendre certains mécanismes réactionnels étudiés pendant la thèse.

Merci à Mathieu Dupoy pour son aide dans la conception de bancs optiques.

Je n'oublie pas Marjorie qui, au cours de son stage de Master 2, a obtenu de très bons résultats. Je lui souhaite bon courage pour sa thèse.

Ces trois années de thèse ont été enrichissantes d'un point de vue scientifique mais également humain. De nombreuses personnes m'ont soutenu et je m'excuse par avance si j'en oublie certaines. Je voudrais remercier mes collègues du LCMI dont certains sont devenus des amis. Merci Carole pour ton humour, les pauses thé et les RMN au dernier moment ; Merci Juliette pour les potins, les makis et les week-ends ski. Merci Tarek pour ta gentillesse, ton écoute et d'avoir partagé tes connaissances en matériaux avec moi. J'ai une grande pensée pour toutes les personnes qui sont passées par ou sont toujours au LCMI : Camille, Thomas D., Emilie H., Aurélien, Hélène, Prisca, Emilie B., Jonathan, Thomas C., Aurélie, Fabien. De l'équipe commune CEA-bioMérieux, je souhaite remercier Mathieu, Raph et Véro pour leur bonne humeur et les pauses café ainsi qu'Armelle qui a su trouver les mots pour calmer mes moments de panique pendant la rédaction du manuscrit.

J'ai eu la chance de rencontrer des personnes formidables au SPAM. Merci à Stéphanie : entre thésardes, nous nous sommes soutenues ! Je voudrais remercier Hieu, Sandrine K., Jérémy, Thomas G., Adeline pour leur bonne humeur, leur soutien et leur écoute dans les moments difficiles. Merci à tous ceux qui sont passés par l'équipe capteurs : Rosalie, Sandrine M., Wang-Xian, Emmanuel, Déborah, Florent, William, Claire, grâce à vous les missions sur Saclay ont passé plus rapidement.

Je tiens également à remercier les secrétaires Véronique Birkenheier, Véronique Estève, Daphné Fendler, Jacqueline Bandura, Véronique Gerecny et Caroline Lebe pour leur gentillesse et pour m'avoir tant aidée dans les tâches administratives.

Pour terminer, je souhaite remercier mes amis qui m'ont encouragé pendant ces trois ans. Merci à Mathieu, Sami et Axel pour les soirées parisiennes toujours imprévisibles. Merci Wanda pour « l'hébergement » et les soirées sushis lors de mes missions saclaysiennes. Merci à Camille et Kelly pour leur soutien depuis Barcelone. Aux amis de toujours Laulauré, Marie, Christel, Adeline, Oliv qui ont toujours montré un vif intérêt à ce que je fais et qui répondent toujours présents.

Je remercie tous les membres de ma famille. A Monique, mon grand-père et ma grand-mère. A mes parents et à ma sœur, merci de m'avoir soutenue, écoutée et encouragée tout au long de mes études. Enfin, merci à Miguel. Merci de m'avoir suivie à Grenoble, de m'avoir attendue quand j'étais à Saclay puis finalement supportée pendant la rédaction de ce manuscrit.

Liste des abréviations

ACN : acétonitrile
ADN : acide désoxyribonucléique
AP : aminophénol
APTES : aminopropyltriéthoxysilane
ArOH : Naphthol AS-BI déméthylé : 7-bromo-3-hydroxy-2-naphth-o-hydroxyanilide
ATCC : American Type Culture Collection
ATP : adénosine-5'-triphosphate
BBT : bleu de bromothymol
BG : Bindschedler's green : 4,4'-bis(diméthylamino)diphénylamine
 β -NA : β -naphthylamine
BQ : benzoquinone
CaCl₂ : chlorure de calcium
CCM : chromatographie sur couche mince
cfu : colony forming unity
CNT : carbon nanotube
CO₂ : dioxyde de carbone
CPL : chromatographie en phase liquide
CVS : composés volatils soufrés
DA-64 : N-(carboxyméthylaminocarbonyl)-4,4V-bis(diméthylamino)-diphénylamine
DAO : diamine oxydase
DCPIP : 2,6-dichlorophénolindophénol
DDL : 3,5-diacétyl-1,4-dihydrotoluidine
DEPD : N,N-diéthyl-para-phénylènediamine
DMACA : para-diméthylaminocinnamaldéhyde
DMAP : N,N-diméthyl-para-aminophénol
DMPD : N,N-diméthyl-para-phénylènediamine
DMSO : diméthylsulfoxyde
DO : densité optique
DTNB : acide 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoïque)
EB : bleu d'éthylène
ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ELSD : détecteur à diffusion de lumière après évaporation
EPT : eau peptonée tamponnée
EtOH : éthanol
FeCl₃ : chlorure de fer (III)
FRET : Fluorescence Resonance Energy Transfer
FT-IR : Infra-rouge à transformée de Fourier
H₂S : sulfure d'hydrogène
H_{cc} : constante de Henry
H₂SO₄ : acide sulfurique
HCl : acide chlorhydrique
HDH : histamine déshydrogénase
HEPES : 4-(2-hydroxyléthyl)-1-pipérazine éthanesulfonique
HQ : hydroquinone
HR : humidité relative

IMS : ion mass spectrometry
INRS : Institut National de Recherche et de Sécurité
 K_a : constante d'association
KCl : chlorure de potassium
KOH : hydroxyde de potassium
L-ala- β NA : L-alanine- β -naphthylamine
MALDI-TOF MS : Matrix-Assisted laser Desorption/Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry
MB : bleu de méthylène
mCOV : Composé Organique Volatil microbien
MeOH : méthanol
MES : acide 3-morpholino-éthanesulfonique
MeSH : méthanethiol
Me-S-S-Me : diméthylsulfure
Me₂S : diméthylsulfure
MKTTn : bouillon de Muller-Kaufmann au tétrathionate-novobiocine
MOPS : 3-(N-morpholino)propanesulfonique
MOS : metal oxide semi conductor
Na₂S : sulfure de sodium
NaOH : soude
NDA : 2,3-naphtalènedicarboxaldéhyde
NH₃ : ammoniac
NO : monoxyde d'azote
oNP : ortho-nitrophénol
OPA : ortho-phthaldéhyde
OSPO : polyamine oxydase extraite de semis d'avoine
P1 : 2-méthylthio-4-N,N-diméthyl-phénylènediamine
P2 : → 2,5-méthylthio-4-N,N-diméthyl -phénylènediamine
PCR : Polymerase Chain Reaction
PDMS : polydiméthylsiloxane
PEG : polyéthylèneglycol
PMS : 5-méthylphénaziniumméthylsulfate
pNP : paranitrophénol
pNPG : substrat 4-nitrophénylglucuronide
ppb : partie par billion
ppm : partie par million
PVA : acide polyvinylique
QD : quinonediimine
Qm : quinonemonoimine
QP : o-hydroxyquinonephtaléine
QS : quinine sulfate dihydrate
RMN : résonance magnétique nucléaire
RPE : résonance paramagnétique électronique
SAW : Surface Acoustic Wave sensor
SERS : surface enhanced Raman spectroscopy
SIFT-MS : Selected Ion Flow Tube Mass Spectrometry
Spm : spermidine

TMOS : tétraméthylorthosilicate

TNB : acide 2-nitro-5-thiobenzoïque

TNT : trinitrotoluène

WR : Wurster's Red

WST-8 : 2-(2-méthoxy-4-nitrophényl)-3-(4-nitrophényl)-5-(2,4-disulfophényl)2H-tétrazolium

ZnPcTS : phtalocyanine de zinc tétrasulfonée

Chapitre 1 : Introduction à la problématique de la détection de pathogènes en agroalimentaire

I. Techniques de détection et d'identification en microbiologie	9
I.1. Contexte	9
I.2. Méthodes de détection et d'identification traditionnelles	10
I.3. Méthode normalisée de détection de Salmonella.....	14
II. Les métabolites volatils microbiens	16
III. Détection des mCOV : Etat de l'art	18
III.1. Spectrométries de masse	18
III.2. Techniques alternatives : les nez électroniques avec transduction électrique	20
III.3. Détection optique	22
III.3.1. Les nez colorimétriques	22
III.3.2. Les capteurs colorimétriques à base de matériaux hybrides organiques-inorganiques.....	23
IV. Présentation du sujet de thèse	26
IV.1. Choix des mCOV	26
IV.2. Stratégies développées pour l'élaboration de capteurs.....	27
IV.2.1. Choix de la molécule sonde et étude de sa réactivité en solution	27
IV.2.2. Choix de la matrice solide	27
IV.2.3. Exposition des capteurs aux mCOV et détection.....	28

I. Techniques de détection et d'identification en microbiologie

I.1. Contexte

En France, en 2009, 13905 personnes ont été touchées par des toxi-infections alimentaires dont 9 sont décédées. [1] Les bactéries responsables de ces infections sont le plus souvent *Salmonella*, *Clostridium perfringens*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Staphylococcus aureus* et plus récemment *Escherichia coli* et *Listeria monocytogenes*. Ces bactéries sont généralement présentes sur la viande, les œufs, la charcuterie, le poisson et les produits laitiers (Tableau 1). La prolifération de ces bactéries entraîne la formation de substances toxiques, comme l’histamine, et modifie les qualités organoleptiques des aliments. [2]

Afin d’éviter de telles contaminations, les industriels de l’agroalimentaire surveillent la qualité de leurs matières premières et analysent les denrées produites. C’est d’ailleurs dans le domaine de la détection de pathogènes que le marché est le plus important. Aux États-Unis, en 2000, 27,5 millions de tests de détection de pathogènes ont été effectués ce qui représente un marché de 192 millions de dollars. [3] Au-delà de la sûreté sanitaire, la vigilance est une nécessité économique car la présence de pathogènes dans un produit entraîne de coûteux rappels de lots. En 2008, à Toronto au Canada, le rappel de lots de viande contaminée par *Listeria monocytogenes* a coûté 20 millions d’euros à l’entreprise qui les avait produits. [4] Les méthodes microbiologiques traditionnelles actuellement utilisées pour l’isolement et l’identification de *Salmonella* contenue dans l’alimentation sont chronophages et ne fournissent un résultat qu’en 4 à 5 jours. [5,7] Il existe donc un réel besoin de méthodes nouvelles et rapides pour l’identification de bactéries pathogènes en industrie agroalimentaire.

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

Tableau 1 : Récapitulatif des pathogènes responsables d’intoxications alimentaires et des aliments à surveiller. ^a : quantité d’agent pathogène ou de toxine à ingérer pour présenter les symptômes de la maladie. [6]

1.2. Méthodes de détection et d'identification traditionnelles

Les méthodes traditionnelles de détection se déroulent généralement en trois étapes. [7] Du fait de la complexité des matrices alimentaires et du faible nombre de bactéries à détecter dans un échantillon, une première étape d'enrichissement est nécessaire. Elle consiste à incuber l'échantillon dans un milieu nutritif non sélectif qui va permettre à tous les micro-organismes de se multiplier (Annexe 1) et donc faciliter leur détection. Lors de la deuxième étape appelée enrichissement sélectif, le milieu enrichi est transféré dans un milieu sélectif dont le rôle est de favoriser la croissance du pathogène recherché tout en défavorisant le développement du reste des micro-organismes. L'inoculation d'un milieu gélosé sélectif avec cette dernière culture permet l'isolation du pathogène. Des tests biochimiques sont ensuite réalisés à partir d'une colonie isolée afin de l'identifier.

Différentes méthodes d'identification des bactéries ont été développées au fil des progrès scientifiques et permettent, grâce à divers examens, d'identifier le genre (définition en Annexe 2), l'espèce et la souche du micro-organisme (Figure 1). Dès le XVIIe siècle, l'observation macroscopique et microscopique des bactéries permet une classification préliminaire (Antoine van Leeuwenhoek, 1673). [8] En effet, la taille des bactéries étant de l'ordre du micromètre, il est possible de les observer au microscope optique. L'étude de leur forme (coque ou bacille), de leur taille, de leur aspect (filamenteux, rugueux, lisse), de leur mobilité (présence de flagelle), de leur mode de groupement (en chaînes, en amas) ainsi que la coloration de Gram établie en 1884 par Hans Christian Gram (Annexe 3) sont autant d'indices morphologiques sur la structure de la cellule et la composition des enveloppes cellulaires.

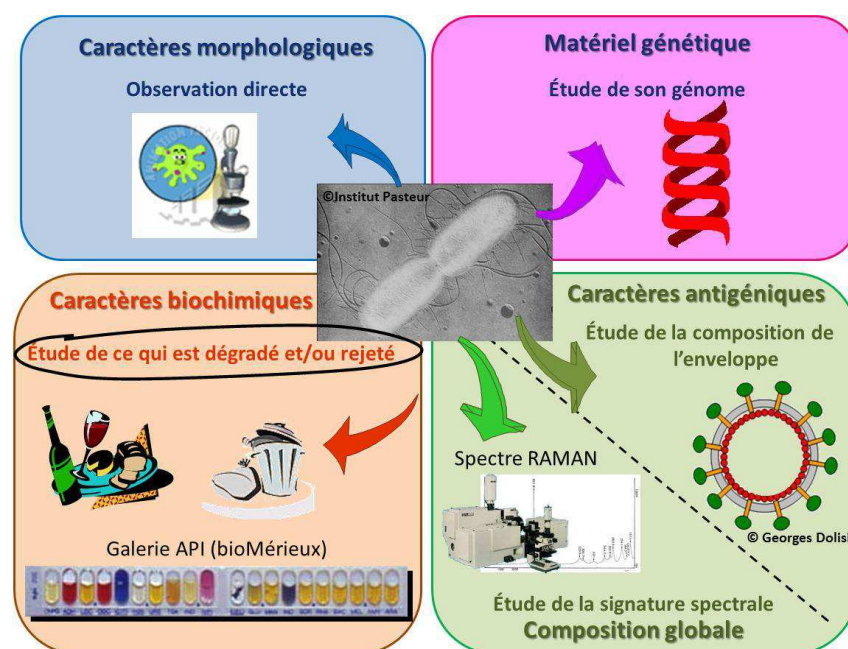


Figure 1 : Présentation schématique des différents caractères et des différentes techniques permettant d'identifier une bactérie (non exhaustif).

Parce que tous les micro-organismes ne sont pas capables de dégrader les mêmes substrats, des tests biochimiques ont été mis en place afin de connaître le phénotype des micro-organismes. Il s'agit d'identifier l'activité enzymatique de la bactérie en observant ce qu'elle dégrade et ce qu'elle produit. Prenons l'exemple d'un inoculum exposé à différents substrats. Les différentes enzymes produites par la bactérie permettent la dégradation de certains substrats. Les produits de dégradation ainsi formés peuvent être colorés (substrats chromogènes), fluorescents (substrats fluorogènes), former un précipité, avoir des propriétés acido-basiques qui seront révélées avec un indicateur coloré (Tableau 2). [9] Actuellement, les kits d'identification rapide commercialisés (galerie API de bioMérieux, Enterotube II de Becton-Dickinson et Micro ID de Thermoscientific) s'appuient sur la détection colorimétrique et fournissent une réponse en 24 heures. Les vials jetables pré-remplis de milieux chromogènes commercialisés par BioLumix [10] se basent sur le même principe à la différence que la détection est automatisée et effectuée au spectrophotomètre, permettant d'abaisser le temps de réponse à 12 heures. L'appareil coûte 15 000 dollars et les vials jetables entre 2 et 3 dollars l'unité. Des équipes de recherche comme celle de Jokerst *et al.* ont récemment appliqué cette méthode à des bandelettes de papier imprégnées de substrats chromogènes pour diminuer le coût de fabrication de ces tests, sans pour autant nuire à la vitesse de détection (temps de réponse : 8-12 heures). [11] Des tests commerciaux, dits « par contact », tels que les Bacter-Tests permettent de contrôler l'état de désinfection de plans de travail et d'ustensiles en milieu alimentaire en seulement 6 à 10 heures. [12] Un écouvillon est mis en contact de la surface à analyser puis plongé dans un milieu de culture dont la couleur change en présence du micro-organisme recherché. [13]

Rapides et peu coûteux (2,50€ le test), ces tests ne s'adressent toutefois qu'à la vérification de l'absence d'un pathogène précis dans un milieu auparavant nettoyé.

Une étude de la résistance aux antibiotiques peut venir compléter l'identification, notamment s'il faut adresser le traitement adéquat à un patient.

Les études morphologiques et biochimiques permettent, dans certains cas, l'identification jusqu'à la souche. Sinon, une analyse se basant sur la composition de l'enveloppe cellulaire est nécessaire pour identifier la souche. La membrane des bactéries est recouverte d'antigènes. Grâce à la réaction spécifique antigène-anticorps, des méthodes immunologiques comme l'immunofluorescence ou le test ELISA permettent d'identifier des pathogènes comme les salmonelles. L'équipe de Geng *et al.* a ainsi mis au point une fibre optique recouverte de couches sensibles contenant un anticorps fluorescent pour la détection de *Listeria monocytogenes*. [14] La démarche d'utiliser des anticorps est déjà exploitée par la société VICAM qui commercialise le ListerTest. [15] Ce test présente l'avantage de s'affranchir de la phase d'enrichissement puisque des billes magnétiques recouvertes d'anticorps reconnaissant *Listeria monocytogenes* sont directement introduites dans l'échantillon alimentaire. Les billes sont ensuite récupérées à l'aide d'un aimant, rincées puis étalées sur un milieu nutritif gélosé incubés à 37°C pendant 22 heures. Le temps de réponse de ce dispositif reste long.

Tests	Composant actif (quantité en mg/cupule)	Phénomène mis en évidence	Révéléateur utilisé	Résultat négatif	Résultat positif
ONPG	2-nitrophényl- β ,D-galactopyranoside (0,223)	Présence de β ,D-galactopyranosidase	Aucun	Incolore	Jaune
<u>ADH</u>	L-arginine (1,9)	Présence d'arginine désaminase	Rouge de phénol	Jaune	Rouge/orangé
<u>LDC</u>	L-lysine (1,9)	Présence de lysine décarboxylase	Rouge de phénol	Jaune	Rouge/orangé
<u>ODC</u>	L-ornithine (1,9)	Présence d'ornithine décarboxylase	Rouge de phénol	Jaune	Rouge/orangé
<u> CIT </u>	Citrate de trisodium (0,756)	Utilisation du citrate comme source de carbone	Bleu de bromothymol (BBT)	Jaune	Bleu
<u>H₂S</u>	Thiosulfate de sodium (0,075)	Production d'H ₂ S	Fe ³⁺	incolore	Dépôt noir (de Fe ₂ S ₃)
<u>URE</u>	Urée (0,76)	Présence d'uréase	Rouge de phénol	Jaune	Rouge/orangé
TDA	L-tryptophane (0,38)	Présence de tryptophane désaminase	Ajout de FeCl ₃ après incubation	Jaune	Marron-rougeâtre
IND	L-tryptophane (0,19)	L-tryptophanase	Réactif de James (4-diméthylamino-2-méthoxybenzaldéhyde)	Incolore	Rose
<u> VP </u>	Pyruvate de sodium (1,9)	Production d'acétoïne (3-hydroxybutanone)	Ajout de VP1 et VP2 (1-Naphthol et KOH) après incubation	Incolore	Rose-rouge
<u> GEL </u>	Gélatine (0,6)	Présence de gélatinase	Ajout d'une solution de particules de charbon	Non diffusion	Diffusion des particules
GLU	D-glucose (1,9)	Fermentation du glucose	BBT	Bleu	Jaune
MAN	D-mannitol (1,9)	Fermentation du mannitol	BBT	Bleu	Jaune
INO	Inositol (1,9)	Fermentation de l'inositol	BBT	Bleu	Jaune
SOR	Sorbitol (1,9)	Fermentation du sorbitol	BBT	Bleu	Jaune
RHA	L-rhaminose (1,9)	Fermentation du rhaminose	BBT	Bleu	Jaune
SAC	D-saccharose (1,9)	Fermentation du saccharose	BBT	Bleu	Jaune

MEL	D-melibiose (1,9)	Fermentation du melibiose	BBT	Bleu	Jaune
AMY	Amygdaline (0,57)	Fermentation de l'amygdaline	BBT	Bleu	Jaune
ARA	L-arabinose (1,9)	Fermentation de l'arabinose	BBT	Bleu	Jaune

Tableau 2 : Ensemble des tests biochimiques contenus dans une galerie API 20E destinée à l'identification des entérobactéries. (Pour les tests dont le nom est souligné, de l'huile de paraffine est déposée au-dessus de la cupule et pour les tests dont le nom est encadré, la cupule doit être remplie jusqu'en haut du tube).

Les méthodes présentées précédemment sont qualifiées de méthodes phénotypiques car elles s'appuient sur le phénotype des micro-organismes pour les identifier. Plus récemment, des méthodes dites génotypiques comme la PCR (Polymerase Chain Reaction, 1986) et le séquençage de génome (1995) ont fait leur apparition et ont permis d'étudier le matériel génétique des bactéries. [16] Ces méthodes permettent de détecter une séquence précise d'ADN et de l'amplifier jusqu'à un million de fois en une heure. [17] La séquence est ensuite identifiée par électrophorèse (temps d'analyse \approx 1 heure). Même les pathogènes à croissance fastidieuse sont détectés. [6] Bien que l'identification soit complète et non influencée par les conditions de culture, ces méthodes ne distinguent pas si le micro-organisme est mort ou vivant. De plus, elles sont chères, nécessitent un personnel qualifié et sont difficilement automatisables. Toutefois, des robots d'analyse arrivent aujourd'hui sur le marché comme le GeneXpert Infinity 80 vendu par la marque Cepheid (500 000 dollars). [18] Cet outil a été mis en place dans une clinique iséroise et permet le dépistage de bactéries responsables de maladies nosocomiales. [19]

Depuis les années 2000, la diffraction de la lumière [20] et l'application de techniques de spectroscopie vibrationnelle comme le RAMAN, [21] l'Infra-Rouge à Transformée de Fourier (FT-IR) [22] se sont beaucoup développées pour la détection de bactéries. Elles reposent sur le fait que chaque composant de la cellule possède une signature spectrale, apportant alors à la cellule sa propre signature. Après réalisation d'une banque de données, il est envisageable de reconnaître une bactérie avant même qu'elle ne commence à se multiplier. Ces techniques permettent de raccourcir les temps d'analyse (quelques centaines de cellules peuvent être identifiées après 6-10 heures d'incubation d'un inoculat à 10^3 cfu/mL). Cependant, il convient de préciser que les spectres obtenus varient selon le milieu de culture et la méthode de préparation d'échantillon utilisés. La méthode FT-IR nécessite le transfert des micro-organismes du milieu gélosé vers un substrat sec, l'eau absorbant l'énergie infra-rouge. Le signal exalté obtenu avec le SERS (Surface Enhanced RAMAN Spectroscopy) est dû à la présence de nanostructures métalliques, comme des nanoparticules d'argent, à proximité des cellules à analyser. La fluorescence des milieux de culture représente un obstacle pour la mise en œuvre d'analyses RAMAN ; celui-ci est surmonté par l'augmentation du nombre de données acquises.

La méthode actuellement retenue dans l'industrie agroalimentaire est celle utilisant l'enrichissement non sélectif/sélectif complété des tests biochimiques. Ainsi la norme

NF/EN/ISO 6579, amendée en octobre 2007, décrit une méthode horizontale pour la recherche de *Salmonella* dans les aliments. [23] Elle est détaillée au paragraphe suivant.

1.3. Méthode normalisée de détection de *Salmonella*

Salmonella est responsable de plus du tiers des toxi-infections alimentaires déclarées chaque année en France. Cette infection est due, la plupart du temps, à l'ingestion d'aliments contaminés. La méthode normalisée ISO 6579 (2002) se compose de quatre étapes décrites ici (Figure 2). [5,23]

- **Pré-enrichissement non sélectif** : Cette première étape consiste à ensemercer un milieu liquide riche comme l'eau peptonée, un bouillon lactosé ou un bouillon de soja tryptique avec l'échantillon d'analyse afin de favoriser la récupération et la croissance des salmonelles. En effet, dans la matrice alimentaire, les bactéries sont soumises au stress et peuvent être endommagées par les agents de conservation, la chaleur ou le froid. Les cultures sont réalisées dans des sacs appelés *stomachers* ou masticateurs pour décoller les bactéries liées à l'échantillon de nourriture et homogénéiser le milieu de culture ainsi inoculé.

- **Enrichissement en milieu sélectif** : Des milieux d'enrichissement sélectif sont inoculés avec la culture de pré-enrichissement afin de favoriser le développement des salmonelles à travers une inhibition sélective de la croissance de micro-organismes. Des inhibiteurs de bactéries à Gram positif comme le vert de malachite, la bile, le sélénium ou le vert brillant sont couramment utilisés. [24]

- **Isolement sur gélose** : Des géloses sélectives et différentielles sont ensemencées avec le milieu enrichi sélectif afin d'obtenir des colonies isolées de salmonelles. Ces géloses contiennent des substrats que seule salmonelle peut métaboliser comme la lysine ou le thiosulfate. De ce fait, les produits issus de la métabolisation, respectivement la cadavérine et H_2S , sont formés (Figure 3) et détectés via l'introduction d'additifs dans la gélose (Figure 4). Par exemple, la présence de cadavérine, par ses propriétés basiques ($pK_{a1} = 10,05$ et $pK_{a2} = 10,93$), entraîne une augmentation du pH du milieu de culture. En introduisant, un indicateur de pH, comme le rouge de phénol, dont la zone de virage est proche du pH du milieu de culture, on fait correspondre l'émission de cadavérine à un changement de couleur (Figure 4). Le citrate ammoniacal de fer (III), quant à lui, permet de détecter H_2S , car il entraîne la formation d'un précipité noir (Fe_2S_3). [25] Des ions ferreux Fe^{2+} peuvent également être utilisés pour former le précipité noir FeS (Figure 4). [26]

- **Sélection biochimique** : les colonies isolées subissent des tests biochimiques pour être identifiées d'après les enzymes qu'elles produisent. Les tests tryptophanase, uréase, lysine et thiosulfate sont les plus courants.

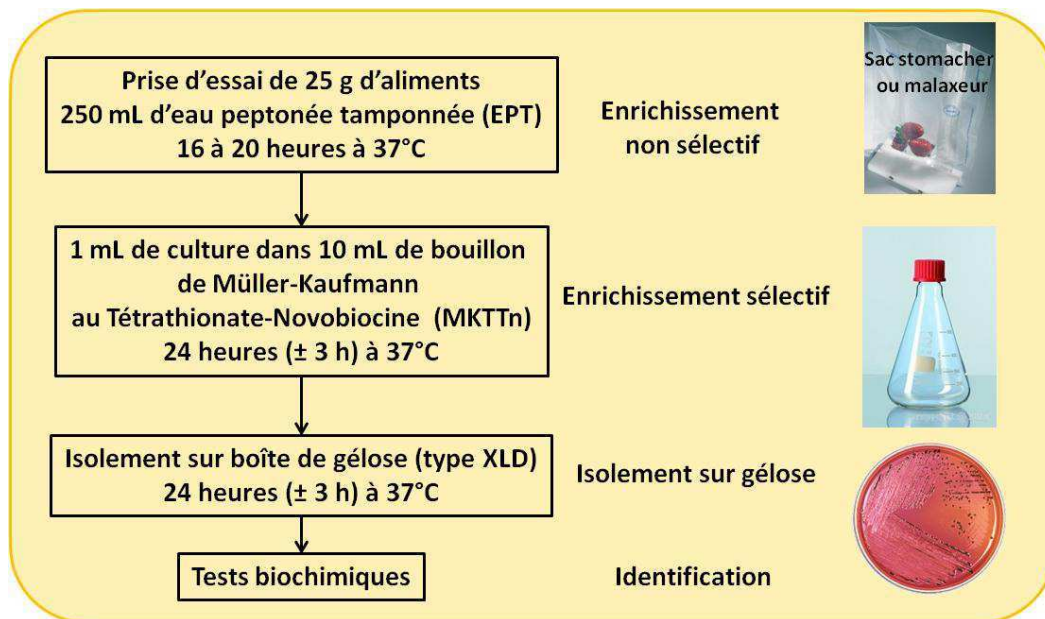


Figure 2 : Procédure de détection de *Salmonella* (2002, norme ISO 6579)

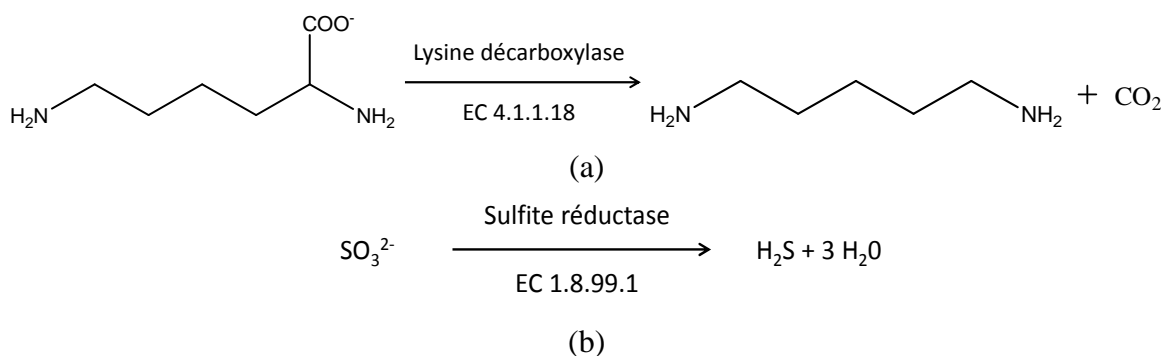


Figure 3 : (a) Formation de cadavérine à partir de la décarboxylation de la lysine ; (b) Formation de sulfure d'hydrogène à partir de sulfates.

Détection de la cadavérine	Détection du sulfure d'hydrogène (H ₂ S)
<p>Rouge de phénol (pKa = 8) pH < pKa → couleur jaune pH > pKa → couleur rouge</p> <p>En présence de cadavérine, l'indicateur est rouge.</p>	<p>En présence d'ions ferreux Fe²⁺,</p> $\text{Fe}^{2+} + \text{S}^{2-} \rightarrow \text{FeS}_{(\text{solide})}$ <p>Formation d'un précipité noir.</p>

Figure 4 : Tests de révélation de la présence de cadavérine et de sulfure d'hydrogène en milieu gélosé.

Nous constatons que la méthode ISO 6579 de détection de *Salmonella* comporte plusieurs étapes nécessitant à la fois l'intervention de main d'œuvre qualifiée et l'emploi de beaucoup de consommables (*stomachers*, boîtes de Petri). En vue de réduire les coûts générés par l'étude de nombreux prélèvements, il serait intéressant de pouvoir discriminer le plus tôt possible, dès l'étape d'enrichissement, les échantillons d'analyse positifs à *Salmonella* des échantillons négatifs. Aujourd'hui, un intérêt croissant pour l'analyse du métabolome microbien semble autoriser une détection non-invasive de pathogènes tels que *Salmonella*. Nous allons donc nous intéresser aux métabolites volatils microbiens au paragraphe suivant.

II. Les métabolites volatils microbiens

L'analyse du génome, c'est-à-dire l'identification des différents gènes contenus dans l'ADN, [27] passionne les chercheurs depuis les années 60. L'attention s'est ensuite tournée vers l'analyse du protéome qui représente l'ensemble des protéines exprimées à partir du génome.

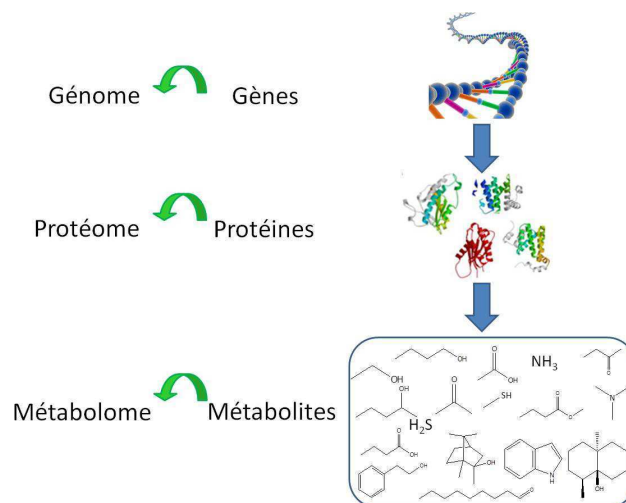


Figure 5 : Schéma décrivant l'origine des métabolites. Les métabolites sont issus de la dégradation de composés présents dans l'environnement de la bactérie par les protéines qu'elle exprime. Ces protéines étant l'expression du génome, les métabolites sont l'expression phénotypique du génome de la bactérie.

L'expression du génotype, *i. e.* le phénotype, dépend de l'environnement de la cellule (stress, température, composition du milieu). Ainsi, le phénotype dépend non seulement du génome (le matériel génétique d'une *E. coli* sera différent de celui d'une *Salmonella*), mais aussi de l'environnement (une même souche de *Salmonella* n'exprimera pas les mêmes protéines selon qu'elle se trouve en conditions aérobie ou anaérobie). [28]

L'analyse de l'ensemble des métabolites, appelé métabolome, est aujourd'hui en pleine expansion car il représente l'expression des protéines qui, elles-mêmes, représentent l'expression du génome (Figure 5). L'étude du métabolome revient donc à étudier les produits finaux de l'expression des gènes qui constituent la signature/le profil biochimique d'une cellule. [29] Les métabolites les plus étudiés sont ceux associés à des pathologies

comme la maladie d'Alzheimer, [30] de Parkinson, [31] les cancers [32,33] car ils permettent la mise en place d'un diagnostic non invasif (pas de biopsie). Les métabolites volatils ou (mCOV) sont de petites molécules chimiques, de bas poids moléculaires, possédant une tension de vapeur élevée et une faible hydrosolubilité (Annexe 4).

Les mCOV issus du métabolisme des micro-organismes recouvrent une grande variété de molécules telles que les alcools, les aldéhydes, les amines, les cétones, les terpènes et les chaînes carbonées aromatiques, chlorées ou soufrées (Tableau 3). [34]

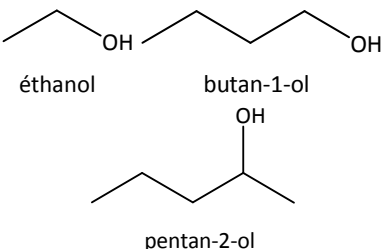
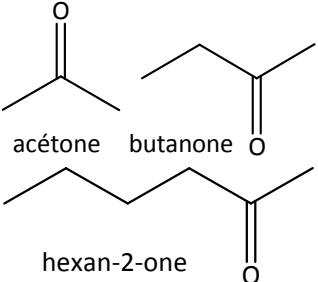
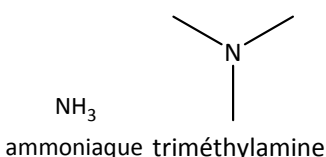
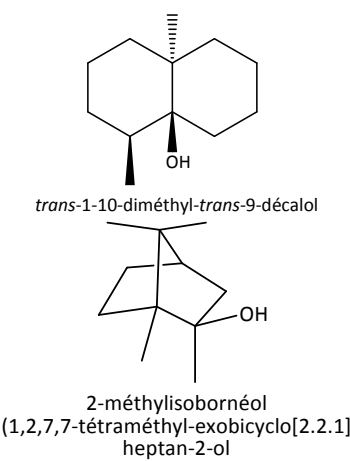
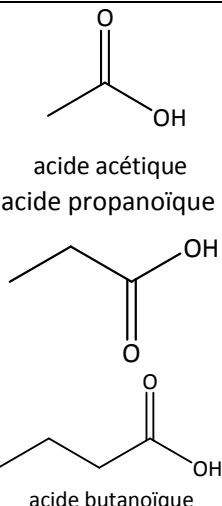
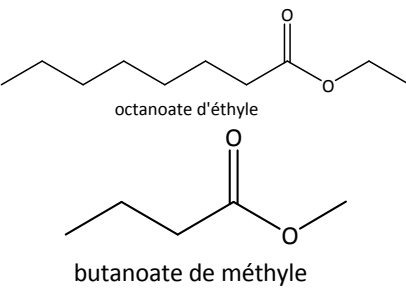
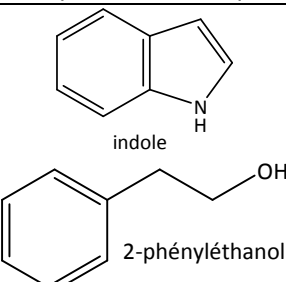
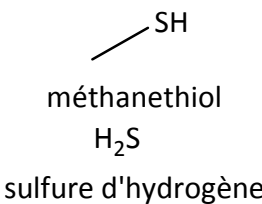
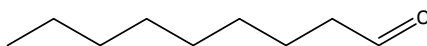
Alcools	Cétones	Amines
 <p>éthanol butan-1-ol pentan-2-ol</p>	 <p>acétone butanone hexan-2-one</p>	 <p>NH₃ ammoniaque triméthylamine</p>
Terpènes	Acides carboxyliques	Esters
 <p><i>trans</i>-1-10-diméthyl-<i>trans</i>-9-décalol 2-méthylisobornéol (1,2,7,7-tétraméthyl-exobicyclo[2.2.1]heptan-2-ol)</p>	 <p>acide acétique acide propanoïque acide butanoïque</p>	 <p>octanoate d'éthyle butanoate de méthyle</p>
Composés aromatiques	Composés soufrés	Aldéhydes
 <p>indole 2-phényléthanol</p>	 <p>méthanethiol H₂S sulfure d'hydrogène</p>	 <p>nonanal</p>

Tableau 3 : Exemples de composés organiques volatils microbiens (mCOV) [34]

Les composés volatils jouent un rôle important dans la nature. Par exemple, le parfum des fleurs attirent les insectes qui participent à la pollinisation, ou certaines chenilles qui émettent une odeur repoussante pour se protéger des prédateurs ou encore l'odeur de putréfaction qui nous retient de consommer des aliments avariés. [35] La capacité des micro-organismes à produire des composés volatils est connue depuis de nombreuses

années. Certaines bactéries, comme *S. typhimurium*, produisent du 2-phényléthanol, un antimicrobien, afin d'inhiber la croissance d'autres bactéries. [36] Ou encore, les mCOV produits par *Lactobacillus plantarium* (acide 1,2-benzènedicarboxylique, dibutyl ester, myristate d'isoproponyl, n-nonadécane, octadécane et n-eicosane) sont utilisés dans des entrepôts de stockage pour lutter contre les champignons responsables de l'apparition de taches sur le bois. [37] La détection de mCOV au-dessus d'un échantillon est signe de la présence de micro-organismes vivants, éventuellement en train de se multiplier. L'idée qu'une odeur puisse être caractéristique d'une espèce de bactérie a fait son chemin et plusieurs groupes se penchent sur l'interprétation des mCOV qui pourraient permettre l'identification de micro-organismes de manière non invasive. Aujourd'hui, de nombreuses publications sont dédiées au diagnostic de pathologies par l'analyse de l'haleine des patients. [29,38] La détection de pathogènes en industrie agroalimentaire et en analyse biomédicale par le biais des mVOC est étudiée depuis les années 1970. [39]

La signature d'une bactérie englobe l'ensemble des différents composés organiques volatils qu'elle est capable de produire. Identifier tous ces composés est serait trop long d'autant plus que la nature et la quantité des mCOV produits changent en fonction de l'environnement dans lequel le micro-organisme se multiplie. Identifier une bactérie consiste donc à reconnaître sa signature c'est-à-dire les COV caractéristiques et discriminants que l'on ne retrouve pas dans la signature d'autres micro-organismes. [40,41] Dans le cas de *Salmonella*, d'après la méthode ISO 6579 décrite au paragraphe §1.3., les COV caractéristiques et discriminants sont le sulfure d'hydrogène et la cadavérine. Détecter la fraction volatile de ces composés afin d'élaborer un test non invasif qui évite une éventuelle contamination de l'échantillon et permet de s'affranchir de la matrice souvent gênante pour l'analyse est l'objectif que nous avons choisi de poursuivre dans cette thèse. Avant de décrire les diverses stratégies que nous avons développées dans ce but, nous ferons tout d'abord un état de l'art de la détection des mCOV.

III. Détection des mCOV : Etat de l'art

III.1 Spectrométries de masse

Une des méthodes les plus utilisées pour l'analyse de mCOV est la spectrométrie de masse. [40] Cette dernière peut être couplée à une méthode de séparation comme la chromatographie en phase gazeuse, [42] la chromatographie multi-capillaire [43] et l'électrophorèse en deux dimensions. [44] Les premières publications sur la détection en spectrométrie de masse de métabolites gazeux provenant de bactéries datent des années 1970. [45]

La spectrométrie de masse permet de connaître le poids moléculaire des métabolites détectés et leurs quantités dans l'échantillon de façon très précise. La spectrométrie à mobilité différentielle [40] et la spectrométrie de masse à transfert de proton [46] analysent directement la phase gazeuse (appelée *headspace* ou espace de tête) située au-dessus des

cultures de bactéries. Pour obtenir un échantillon plus concentré, il est possible d'adsorber les métabolites gazeux sur du charbon actif ou du polydiméthylsiloxane (PDMS) puis de les désorber au moment de l'analyse. [36] Cette méthode est largement utilisée pour les échantillons solides (selles, matrice alimentaire). [42] De récentes études couplant la spectrométrie de masse au tube à flux d'ions sélectif (SIFT-MS) offre des perspectives intéressantes en termes de détection de bactéries et d'identification de susceptibilité aux antibiotiques. [47]

L'interprétation des résultats se fait par comparaison entre les poids moléculaires obtenus et ceux enregistrés dans des bases de données. [35] Comme il s'agit d'une approche phénotypique, il faut prendre garde à comparer les résultats obtenus pour des micro-organismes ayant été cultivés dans les mêmes conditions.

La spectrométrie de masse à temps de vol impliquant une matrice pour la désorption-ionisation de l'échantillon (MALDI-TOF-MS : matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry) est utilisée pour les bactéries depuis les années 1980 [48] et permet, depuis les années 2000, d'analyser la composition complète de cellules intactes. [49] Elle est aujourd'hui utilisée en routine dans les laboratoires de microbiologie. Bien que l'appareillage soit onéreux (180 000-200 000 dollars US), l'investissement est vite rentabilisé par le bas coût des consommables (0,50\$) mais le fonctionnement de l'appareil exige un personnel qualifié. En comparaison, les tests biochimiques coûtent 4 fois plus cher mais n'exigent pas une main d'œuvre qualifiée. [48,49]

Le MALDI-TOF consiste à préparer un mélange à partir de l'échantillon (biomolécules extraites de cultures bactériennes) et d'une matrice organique (co-cristallisation avec de l'acide gentisique ou sinapinique [49,50]). Une fois séché, il est bombardé au laser pour former des ions en phase gaz dont la masse est détectée par spectrométrie de masse. Le rôle de la matrice organique est d'absorber l'énergie apportée par le laser et de séparer les métabolites les uns des autres. [49] Aujourd'hui, il est possible d'étudier directement une colonie unique en l'étalant directement sur le support d'analyse. [49] Le MALDI-TOF est une technique destructive, invasive et onéreuse car elle nécessite du personnel qualifié. Cependant, son avantage est d'obtenir une identification jusqu'à la souche en 10 minutes à partir d'une faible quantité d'échantillon.

L'analyse de métabolites gazeux par spectrométrie de masse génère beaucoup de données qui sont difficiles à traiter. Le seul paramètre étudié pour l'identification étant la masse moléculaire du métabolite, il est impossible de travailler sans base de données. En effet, une même masse pourrait correspondre à plusieurs composés ou fragments de composés ; il faut donc faire appel à des algorithmes pour attribuer un signal à un métabolite.

III.2. Techniques alternatives : les nez électroniques avec transduction électrique

Un seul paramètre de réponse n'est pas suffisant pour caractériser un mélange de métabolites. C'est pourquoi des barrettes de détecteurs (ou array) ont été mises au point pour déterminer la composition d'un mélange. Ces détecteurs sont appelés nez électroniques.

Le nez électronique a été défini par Gardner et Bartlett comme « un instrument disposant d'un réseau de détecteurs chimiques électroniques dont la spécificité est partielle, et équipé d'un système de reconnaissance approprié capable de reconnaître des odeurs aussi simples que complexes ». [51] Cette faible spécificité implique que chaque analyte peut réagir avec plusieurs détecteurs et que chaque détecteur est susceptible d'interagir avec plusieurs analytes. L'interaction ou non des mCOV avec les détecteurs conduit à une réponse multi-paramétrique. Ces réponses sont traitées et comparées à une banque de données. Celle-ci est établie à partir des réponses obtenues pour des composés organiques volatils connus étudiés seuls ou en mélange. Les détecteurs sont le plus souvent des oxydes de métal semi-conducteurs (MOS) ou des polymères conducteurs. [52]

Lorsque des mCOV diffusent vers un MOS, ils réagissent avec l'oxygène de l'air qui est adsorbé à la surface du MOS pour former des molécules porteuses de charges. La réponse du capteur correspond à la modification de la conductance du MOS due à la présence de ces charges. [53]

Afin d'identifier la nature des composants, l'utilisation de plusieurs capteurs avec des caractéristiques différentes est nécessaire. La combinaison d'oxydes métalliques différents (étain, zinc, tungstène) et de divers métaux de dopage (palladium, platine, germanium) permet d'obtenir une réactivité différente selon les composés (aldéhydes, composés soufrés). Ces capteurs sont peu sensibles à l'humidité et assez rapides (temps de réponse 5 à 30 secondes) mais leur point faible reste la stabilité dans le temps. Leur sensibilité peut avoisiner le ppb (10^{-9}) mais nécessite de travailler à des températures élevées (entre 200 et 450 °C). Les capteurs à base de polymères organiques (polyaniline [54], poly-o-méthoxyaniline [55], polypyrrole [56]) présentent l'avantage de travailler à température ambiante tout comme les capteurs à ondes évanescentes (SAW) et à nanotubes de carbone (CNT). Malgré la grande variété de polymères se prêtant à l'élaboration de capteurs, ils ne sont pas sélectifs et présentent une sensibilité médiocre. La sélectivité est apportée à des capteurs comme les SAW et les CNT en greffant la couche sensible avec des molécules présentant des affinités pour certaines familles de gaz à détecter. Des nanotubes de carbone présentant des fonctions COOH en surface détectent le monoxyde de carbone (limite de détection 1 ppm [57]) tandis que le greffage d'une protéine jouant le rôle de récepteur olfactif permet la détection d'un composé odorant en solution, l'amylobutyrate, jusqu'à 10^{-15} M. [58] Incorporés dans des polymères, ou greffés sur leur surface, les CNT entrent dans la composition de détecteurs intégrés dans des nez électroniques [59,60,61] mais l'absence de sélectivité conduit à l'utilisation de traitement de données tel que l'analyse en composantes principales. Des nez électroniques utilisant des capteurs SAW ont été recensés dans la

littérature [62,63] mais semblent peu utilisés dans des appareils commerciaux. [64] Les résultats obtenus pour les capteurs à base de polymères organiques, de SAW et de CNT sont fortement influencés par l'humidité et ont une durée de vie limitée.

Dans le monde, il existe une vingtaine de compagnies dans le domaine des nez électroniques qui utilisent différentes technologies de senseurs. Entre autres, les nez d'AlphaMOS [65] et le MonoNose sont constitués d'une trentaine de MOS (Figure 6). Une étude avec le MonoNose a permis la détection de bactéries, moins de 8 heures après incubation. [66] La technologie du Bloodhound repose sur un système de 14 polymères conducteurs différents qui sont déposés par électropolymérisation. [67,68] Lorsqu'ils sont miniaturisés, les détecteurs consistent en différents dépôts de couches sensibles de 200-300 μ m de diamètre. [69] Le Cyranose 320 proposé par la société Smiths Detection est, quant à lui, composé de 32 détecteurs à base de polymères composites permettant de classer certaines bactéries. [70]

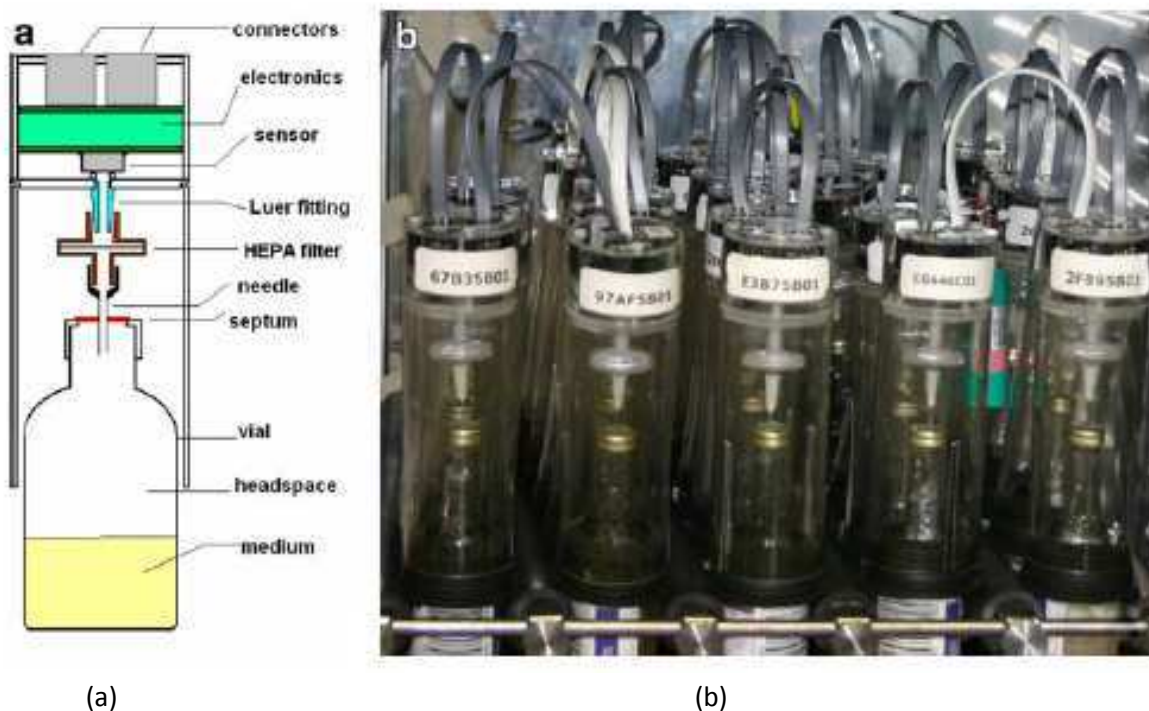


Figure 6 : (a) schéma représentatif du fonctionnement d'un capteur du MonoNose (b) Photographie des 30 capteurs constituant le MonoNose. [66]

Le manque de sélectivité constitue la grande limitation actuelle des nez électroniques. En effet, l'interaction entre un capteur et un mVOC n'est pas spécifique mais relève d'affinités physico-chimiques qui n'apportent qu'une sélectivité partielle. Un capteur peut réagir préférentiellement avec un mCOV par rapport à une autre famille de gaz mais il réagira quand même avec plusieurs mCOV. De plus, le métabolome relevant du phénotype de la bactérie, la signature sera très dépendante des conditions de culture.

III.3. Détection optique

III.3.1. Les nez colorimétriques

Les nez électroniques à transduction électrique ont inspiré d'autres méthodes de détection et il existe désormais des nez électroniques à transduction optique. Les capteurs se présentent sous forme de réseaux et la détection colorimétrique remplace la transduction électrique. La transduction optique présente l'avantage de nécessiter peu d'instrumentation et d'obtenir ainsi des capteurs bas coût. Cependant, l'élaboration d'une bibliothèque de données reste nécessaire pour analyser l'empreinte colorimétrique d'un mélange de mCOV.

Suslick *et al.* ont développé un réseau de capteurs colorimétriques basés sur l'utilisation de métalloporphyrines (Figure 7 (a)). [71] Les métalloporphyrines ont la propriété de changer de couleur lors d'interaction acide-base de Lewis avec des ligands comme les alcools, les amines, les éthers, les phosphines, les thiols, les arènes et les cétones. Le réseau comporte aussi des indicateurs de pH acido-basique (interactions acide-base de Bronsted) et des chromophores solvatochromiques dont la couleur change selon la polarité des vapeurs auxquelles ils sont exposés (Figure 7 (b)). [72]

Afin de limiter l'interférence de l'humidité, le substrat et les substances chimiques adsorbées (molécules sondes) à sa surface sont choisis de façon à être le plus hydrophobe possible. Des amines biogènes comme la triéthylamine et la pyridine à des teneurs inférieures à 100 ppb ont été détectées. [33] Le réseau composé de 36 capteurs permet la détection du sulfure d'hydrogène dans une gamme allant de 50 ppb à 50 ppm. [73]

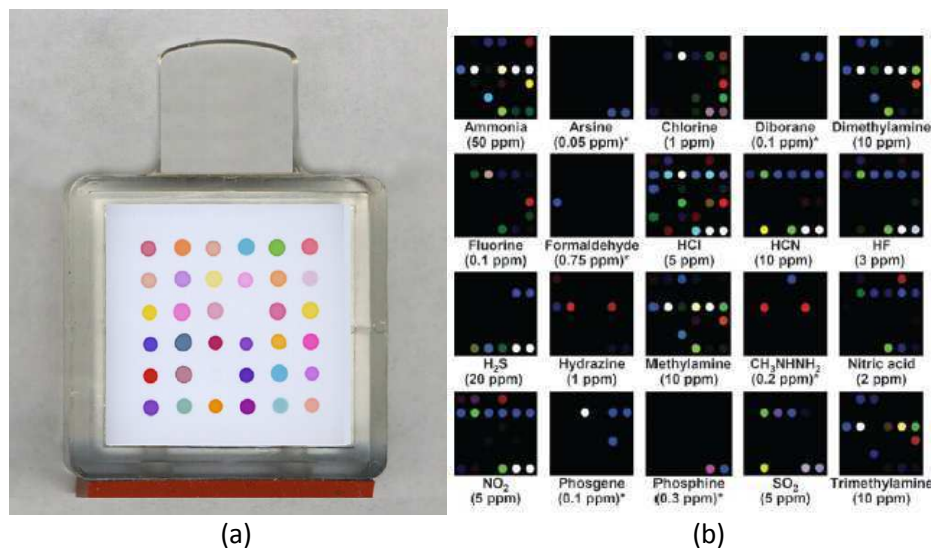


Figure 7 : (a) Photographie d'un réseau de capteurs colorimétriques proposé par Suslick *et al.* [73] (b) Cartographie des réponses colorimétriques du réseau pour différents composés volatils. Cette cartographie est obtenue en soustrayant l'image du capteur avant exposition à l'image du capteur après exposition. [74]

Ce multicapteur présente une facilité d'utilisation grâce à la transduction optique. Cependant, les capteurs saturent très rapidement à cause de la faible quantité de molécules sondes adsorbées sur le substrat. Le manque de sélectivité est ici compensé par le nombre de capteurs. Cependant les interactions entre molécules sondes et polluants cibles sont

basées sur des interactions faibles non covalentes. Ainsi, l'intensité d'une coloration ne varie pas linéairement en fonction du temps, car un polluant cible interagissant fortement avec une molécule sonde peut en déplacer un autre formant une liaison plus faible et induire un changement de coloration.

III.3.2. Les capteurs colorimétriques à base de matériaux hybrides organiques-inorganiques

Pour pallier le problème de sensibilité, d'autres chercheurs ont utilisé des matériaux hybrides poreux avec une grande surface spécifique afin d'augmenter la quantité de gaz adsorbé sur la surface du capteur donc pouvant être détecté.

Xu et son équipe ont proposé un tissu de cellulose imprégné d'oxyde de titane (IV) pour la détection sélective en phase gazeuse de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). [75] Le peroxyde d'hydrogène est un composé souvent détecté en biotechnologie pour suivre la croissance de biomasse et moins souvent pour la détection d'explosif. En se liant irréversiblement au titane, le peroxyde d'hydrogène entraîne l'apparition d'une couleur jaune ($\lambda_{max} = 378 \text{ nm}$, Figure 8). Ce dosimètre jetable possède une limite de détection de 400 ppb d' H_2O_2 en 10 secondes et n'interfère pas avec l'eau, l'oxygène, l'acétone et l'hexane.

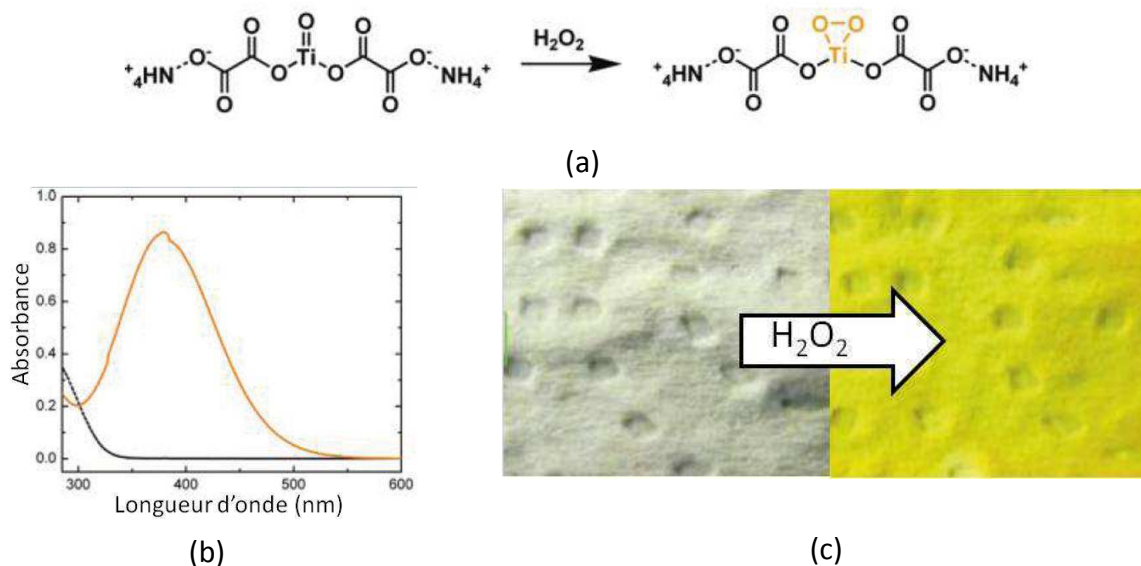


Figure 8 : Détection de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) à l'aide d'un tissu en cellulose imprégné d'oxyde de titane. La réaction décrite en (a) entraîne l'apparition d'un pic d'absorption à 378 nm (b) et le tissu incolore devient alors jaune (c). [75]

D'autres auteurs comme Rakow *et al.* [76] utilisent un polymère intrinsèquement poreux (Figure 9) pris en sandwich entre deux miroirs poreux pour la détection non sélective de styrène et de toluène en phase gazeuse (limite de détection : 20 ppm pour chaque COV). Le polymère, en se gonflant de solvant, change d'indice de réfraction et

d'épaisseur ce qui entraîne un décalage du pic maximal d'absorption UV-visible d'une trentaine de nanomètre. Le polymère choisi étant hydrophobe, aucune interférence avec l'eau n'est observée.

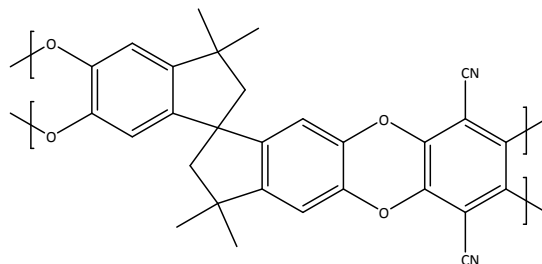


Figure 9 : Formule du polymère hydrophobe utilisé par Rakow *et al.* pour la détection de styrène et de toluène. [76]

Un autre polymère, le poly(tétraphényléthylène-co-cyclotriphosphazène) est utilisé pour la détection d'explosifs : le trinitrotoluène (TNT) et un de ses dérivés, l'acide picrique, par Hu *et al.* [77] Ce polymère émet une fluorescence centrée à $\lambda_{em} = 485$ nm. L'exposition au TNT et à l'acide picrique entraîne une extinction de la fluorescence qui permet d'obtenir une limite de détection de 100 ppm de TNT et 50 ppm d'acide picrique.

Des polymères nanocomposites ont été préparés par incorporation de nanoparticules de cobalt (Co) dans de l'alcool polyvinylique (PVA) avec de la m-nitroaniline, puis déposés en film mince sur une lame de verre pour obtenir un détecteur d'humidité. [78] Celui-ci fonctionne sur une large gamme d'humidité relative ($3\% < HR < 93\%$) et fournit une réponse en 3 secondes. Les auteurs ne précisent pas la durée de vie d'un tel capteur. En effet, l'oxygène de l'air oxyde les polymères, les rendant moins transparents et donc impropres à une détection optique.

Plusieurs articles recensent l'utilisation de fibres optiques dont l'extrémité est recouverte de matériau poreux préparé par voie sol-gel. Des capteurs de dioxyde de carbone (CO_2), [79] d'oxygène (O_2) [80] ainsi que des capteurs de sulfure d'hydrogène [81] et de bactéries telle que *Salmonella* [82] et *Listeria monocytogenes* [14] ont été préparés par incorporation dans le matériau poreux de molécules fluorescentes ou d'enzymes. Cependant, ces capteurs sont utilisés en phase liquide, ce qui ne correspond pas à la détection de métabolites gazeux.

La détection de composés organiques volatils en phase gazeuse à l'aide de matrices hybrides organiques-inorganiques est actuellement en plein essor. Des microsphères de silices imprégnées de vert de bromocrésol ont été déposées en film mince sur un substrat en verre pour la détection d'amines. [83] Le vert de bromocrésol est un indicateur coloré de pH qui, en solution aqueuse, vire de l'orange au bleu lorsque le pH dépasse son pKa qui est de 4,9. Ce capteur n'est pas sélectif, toutefois, en présence de tert-butylamine, une plage de détection allant de 1,4 ppb à 2 ppm a pu être déterminée en 20 secondes. L'eau représente un interférent important pour ce capteur mais sa présence n'a été testée qu'à une teneur de quelques ppm. Un capteur d'acide chlorhydrique, basé sur le même principe, a été préparé par Pistore *et al.* [84] Ce capteur consiste en une matrice préparée à partir de bis(triéthoxysilyl)octane et dopée de rouge de phénol. Cet indicateur coloré présente une

zone de virage autour de pH = 8,2. En présence d'acide, la matrice passe du jaune au rouge. Les auteurs n'indiquent pas de limite de détection ni l'influence des interférents éventuels.

Des matériaux mésoporeux ont été greffés par les équipes de Descalzo [85] et Comes [86] à l'aide, respectivement, d'une sonde fluorescente et d'une sonde colorimétrique. La première permet la détection d'acétone avec une limite de 300 ppm ; elle n'est pas sélective et permet de distinguer les solvants polaires (films violets) des solvants apolaires (films roses). La deuxième permet la détection presque sélective d'amines primaires dont la longueur de chaînes carbonées est discriminante vis-à-vis des amines. Bien que les limites de détection ne soient pas indiquées, les amines possédant une chaîne entre 7 et 9 carbones sont préférentiellement détectées.

La plupart des capteurs décrits ci-dessus sont peu spécifiques et ne s'adressent pas à la détection de bactéries. La démarche adoptée par Paoloacci *et al.* [87] se rapproche davantage de ce qu'une détection de *Salmonella* exige à savoir la détection de métabolites gazeux microbiens de manière spécifique.

Le formaldéhyde est produit par certains champignons [88] et micro-organismes marins. [89,90] Les auteurs ont utilisé des matrices poreuses dopées avec un réactif, le Fluoral-P, qui réagit sélectivement avec le formaldéhyde pour former la 3,5-diacétyl-1,4-dihydrolutidine (DDL) dont le pic maximal d'absorption se situe autour de $\lambda_{\text{max}} = 410 \text{ nm}$. [91] La matrice poreuse passe alors du jaune à l'orange (Figure 10). La DDL peut aussi être détectée en fluorescence ($\lambda_{\text{ém}} = 512 \text{ nm}$, [87]). La réponse à l'exposition en phase gazeuse est obtenue en 3 minutes sur une gamme de détection allant de 0 à 30 ppb \pm 5 ppb.



Figure 10 : le monolithe jaune dopé au Fluoral-P, à gauche, permet une détection colorimétrique car il devient orange, à droite, en présence de formaldéhyde. [91]

Crunaire *et al.* ont également suivi cette démarche pour la détection d'indole. L'indole est un métabolite formé par les bactéries dites tryptophanase-positives lors de la dégradation de l'acide aminé tryptophane. Le *para*-diméthylaminocinnamaldéhyde (DMACA) a été choisi comme molécule sonde car il réagit en quelques minutes, avec l'indole pour donner un sel d'azafulvénium de couleur bleu-vert (Figure 11). Ce produit absorbe à 624 nm et possède un coefficient d'extinction molaire très élevé ($\epsilon_{624\text{nm}} = 97\,000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). [92]

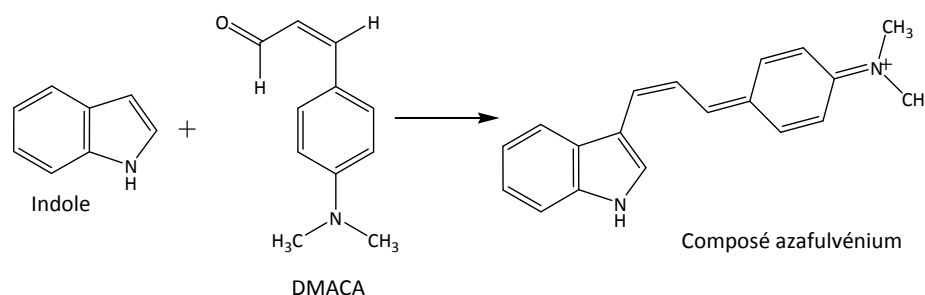


Figure 11 : Un sel d'azafulvénium est formé lors de la réaction sélective du *para*-diméthylaminocinnamaldéhyde (DMACA) sur l'indole.

Des monolithes préparés à partir de la méthode sol-gel, dopés avec du DMACA, ont été exposés à la phase gazeuse de cultures de bactéries en milieu gélosé (inoculé avec 10^8 - 10^9 cfu) afin de discriminer les bactéries produisant de l'indole ou non. En présence d'indole, les capteurs deviennent vert foncé tandis qu'en absence d'indole, les monolithes deviennent orange (Tableau 4). La sensibilité du capteur est telle que l'indole est détecté au bout de 7 heures, avant même que les colonies de bactéries ne soient visibles à l'œil nu.




<i>E.coli</i> ATCC 11775	Essai témoin (sans bactérie)	<i>H.alvei</i> ATCC 13337
 (a)	 (b)	 (c)

Tableau 4 : Photographies de monolithes dopés DMACA exposés à différentes souches de bactéries. Au bout de 24 heures (a) *E. coli* forme de l'indole qui entraîne la formation du sel d'azafulvénium au sein des pores conférant au monolithe une couleur vert foncé (b) En absence d'indole, le monolithe est orange (c) *H. alvei* ne forme pas d'indole et le monolithe est orange (b).

[92] Note : le n° ATCC est défini dans l'Annexe 2.

IV. Présentation du sujet de thèse

L'état de l'art de la détection des mCOV montre que les approches suivies par Paolacci *et al.* [87] et Crunaire *et al.* [95] semblent les plus attractives pour la détection de pathogènes en phase gazeuse. L'élaboration de capteurs pendant cette thèse suivra la même démarche. Ces capteurs doivent pouvoir être utilisés aussi bien en diagnostic médical qu'en veille agroalimentaire. Ils devront être rapides (temps de réponse < 12 heures), faciles à utiliser, peu coûteux, peu encombrants et sensibles.

Deux stratégies ont été développées au cours de cette thèse. La première, qui cible la détection des mCOV **endogènes** provenant d'un milieu de culture de bactéries, consiste en l'élaboration d'un multi-capteur, capable de détecter quelques mCOV cible de manière sélective. La seconde stratégie cible la détection de mCOV **exogènes**. Il s'agira dans ce cas d'introduire un substrat synthétique pouvant libérer un métabolite volatil, mCOV **exogène**, sous l'action d'une enzyme spécifique de la bactérie cible. Ce mCOV exogène sera détecté par un capteur spécifique. Le choix de la nature des mCOV endogènes et exogènes repose sur les activités métaboliques des différents pathogènes.

IV.1. Choix des mCOV

Les salmonelles constituent le seul groupe connu d'entérobactéries qui décarboxylent régulièrement et rapidement la lysine en **cadavérine** et qui produisent beaucoup d'**H₂S**. [93,94] Ces deux mCOV sont donc choisis pour la détection de *Salmonella*.

D'autres bactéries comme *Clostridium spp.* [26,95,96,97] sont également susceptibles de produire du sulfure d'hydrogène et de la cadavérine. D'où l'intérêt de détecter l'enzyme C8-estérase, spécifique de *Salmonella*, [98] en introduisant un substrat synthétique pouvant libérer un métabolite volatil sous l'action de cette dernière.

Salmonella étant un pathogène de classe 2 et seules les bactéries de classe 1 telles que *Escherichia coli* et *Citrobacter freundii* pouvant être manipulées au laboratoire, le concept de mCOV exogènes sera donc illustré avec d'autres voies enzymatiques que la C8-estérase telle que l'activité β -glucuronidase, spécifique d'*Escherichia Coli*, et l'activité L-alanine-arylamidase, présente chez plusieurs espèces de bactéries. Les mCOV exogènes choisis pour la mise en évidence de ces activités enzymatiques sont respectivement le **p-nitrophénol (pNP)** et la **β -naphthylamine (β -NA)**.

IV.2. Stratégies développées pour l'élaboration de capteurs

Pour chaque mCOV, un capteur spécifique sera développé. Son développement nécessite plusieurs phases, qui sont ici décrites.

IV.2.1. Choix de la molécule sonde et étude de sa réactivité en solution

Les molécules sondes sélectionnées devront répondre aux critères suivants :

- La réaction entre la molécule sonde et le mCOV cible forme un produit absorbant ou fluorescent. Les propriétés optiques du produit doivent être différentes de celles des réactifs
- La réaction doit atteindre rapidement l'équilibre (quelques minutes).
- La réaction doit être irréversible avec un bon rendement. Cette propriété fait du capteur un dosimètre (aspect cumulatif)
- Le produit de la réaction absorbant (ou fluorescent) doit présenter un bon coefficient d'extinction molaire (ou un bon rendement quantique de fluorescence).

Cette étape d'étude de la réactivité de la molécule sonde vis-à-vis du mCOV cible en solution est primordiale. Elle permet de connaître l'environnement favorable à la réaction qu'il faudra reproduire dans une matrice solide.

IV.2.2. Choix de la matrice solide

Le choix des matrices repose sur les matériaux hybrides organiques inorganiques élaborés selon un procédé de **chimie douce** appelé le **procédé sol-gel**. Cette appellation vient du fait que les réactifs sont mélangés au départ dans une solution alcoolique (sol) qui, par hydrolyse et condensation, se gélifie pour donner un gel. Lors de l'évaporation du solvant, le gel se rétracte jusqu'à obtenir un verre poreux. Les matrices inorganiques sont réputées pour leur inertie chimique et leur stabilité. [99] La structure poreuse de ces matériaux permet d'obtenir des surfaces spécifiques d'adsorption de l'ordre de 400 à 1000 m²/g ce qui leur confère une grande capacité à piéger et concentrer les gaz. La **grande variété de précurseurs** disponibles commercialement permet de fonctionnaliser la surface

avec des groupements basiques, acides, hydrophiles, hydrophobes et de modifier ainsi l'environnement local dans les pores. Cet environnement sera optimisé pour exalter la réaction entre la molécule sonde et le mCOV cible. De plus, l'utilisation de divers précurseurs permet de faire varier la distribution de taille de pores pour mieux l'adapter au mCOV cible. [74] Une synthèse à température ambiante et des **modes variés de dopage** sont également les atouts de cette méthode, qui sera mise en œuvre pour les différentes molécules sonde et mCOV cible.

Ces matériaux peuvent prendre différentes formes selon le moule choisi et sont par ailleurs transparents, propriétés propices pour une détection optique.

IV.2.3. Exposition des capteurs aux mCOV et détection

Les expositions des capteurs aux mCOV seront réalisées de différentes manières, soit à partir de mélanges gazeux calibrés des mCOV cible, soit à partir de la phase gazeuse générée par une culture de bactéries.

Ces différentes étapes seront suivies pour l'élaboration des différents capteurs. Le chapitre 2 décrit la mise au point des capteurs de composés sulfurés, H₂S et MeSH, et le chapitre 3 est consacré au capteur de cadavérine. Le chapitre 4 est dédié à la stratégie de détection des mCOV exogènes avec les études des activités enzymatiques β-glucuronidase et L-alanine-arylamidase. Il sera suivi de la conclusion générale.

Chapitre 2 : Détection des sulfures

I. Les composés sulfurés : sources et propriétés	31
I.1. Sources biologiques.....	31
I.2. Généralités sur le sulfure d'hydrogène.....	33
II. Méthodes de détection de H₂S et MeSH : Etat de l'art	34
II.1. Capteurs électrochimiques	34
II.2. Méthodes de détection optique	36
II.2.1. Détection par formation d'un précipité.....	36
II.2.2. Utilisation de biocapteurs:	37
II.2.3. Détection par fluorescence	37
II.2.4. Détection par absorption dans l'UV-visible :	39
II.3. Choix de la molécule sonde.....	44
III. Propriétés optiques et rédox du bleu de méthylène	45
III.1. Formes acido-basiques du bleu de méthylène	45
III.2. Spectre UV-Visible du bleu de méthylène	46
III.3. Coefficients d'extinction molaire des différentes formes du bleu de méthylène	47
III.4. Rendement quantique de fluorescence du bleu de méthylène	48
III.5. Etude des formes oxydées et réduites du bleu de méthylène	48
IV. Description du mécanisme de formation du bleu de méthylène	49
IV.1. Etat de l'art.....	49
IV.2. Mesures du rendement de formation de MB en fonction de l'acidité du milieu	52
IV.3. Propriétés de la DMPD oxydée et de ses dérivés : Etat de l'art	53
IV.3.1. Le Wurster's Red	54
IV.3.2. La Quinone diimine	55
IV.3.3. Sous produits d'oxydation	56
IV.4. Etude expérimentale des formes oxydées de DMPD	58
IV.4.1. Oxydation homogène avec FeCl ₃	59
IV.4.2. Oxydation hétérogène en électrochimie	64
IV.4.2.a. Etude en voltampérométrie cyclique	65
IV.4.2.b. Etude en électrolyse	67
IV.4.3. Etude en résonance paramagnétique électronique (RPE)	71
IV.5. Etude de la réaction en solution de la DMPD oxydée par le FeCl ₃ avec des sulfures .	73
IV.5.1. Etude de la réaction en solution de la DMPD oxydée par FeCl ₃ avec l'anion disulfure (Na ₂ S).....	73
IV.5.1.a. Etude de la réaction en solution diluée	73
IV.5.1.b. Etude d'une solution concentrée en DMPD et FeCl ₃ et de sa réactivité vis-à-vis de Na ₂ S	76
IV.5.2. Etude de la réaction en solution de la DMPD oxydée par le FeCl ₃ avec MeSH	77
IV.5.3. Etude de la réaction de compétition entre MeSH et H ₂ S en solution	79
IV.6. Caractérisation de P1, produit de la réaction entre la QD et MeSH.....	80
V. Synthèse et caractérisation des monolithes	81
V.1. Synthèse de monolithes.....	81
V.1.1. Synthèse de monolithes pour la détection d'H ₂ S et de MeSH	82

V.1.2. Monolithes dopés au bleu de méthylène commercial	84
V.2. Caractérisation de monolithes dopés de réactifs	85
V.2.1. Détermination des paramètres de porosité des monolithes	85
V.2.2. Estimation du nombre de pores efficaces dans un monolithe	86
VI. Exposition de monolithes et caractérisation sur banc de dilution	90
VI.1. Exposition des monolithes à de fortes concentrations d'H ₂ S.....	91
VI.2. Exposition des monolithes à de fortes concentrations de MeSH.....	94
VI.3. Exposition de monolithes à H ₂ S et MeSH	95
VI.4. Exposition à de faibles teneurs de H ₂ S à partir de mélanges gazeux calibrés.....	96
VI.4.1. Description du banc de dilution	96
VI.4.2. Calibration de la bouteille H ₂ S	98
VI.4.3. Exposition à H ₂ S en dynamique	100
VII. Tests biologiques	101
VII.1. Choix des souches	101
VII.2. Description du montage d'exposition.....	101
VII.3. Exposition des capteurs	102
VIII. Conclusion	104

I. Les composés sulfurés : sources et propriétés

I.1. Sources biologiques

Il a été montré que les micro-organismes jouent un rôle significatif dans la production d'espèces volatiles sulfurées (sulfure d'hydrogène, méthane-thiol, diméthyl sulfure, diméthyl disulfure, disulfure de carbone) par la réduction de sulfate et la dégradation d'acides aminés sulfurés. [34] Certaines plantes et algues synthétisent le 3-diméthylsulfoniopropionate (DMSP) qui est ensuite dégradé par des bactéries marines produisant ainsi du méthane-thiol (MeSH), du sulfure d'hydrogène (H_2S) et du diméthylsulfure (Me_2S). [34] Les bactéries et archaebactéries produisant des enzymes sulfate réductases sont capables de former des composés volatils sulfurés (CVS) en réduisant les sulfates (SO_4^{2-} , où le soufre est à l'état d'oxydation +VI) en sulfures (H_2S , où le soufre est à l'état d'oxydation -II). [34] En effet, lorsqu'elles se développent en condition anaérobie, ce sont les sulfates qui remplacent l'oxygène en tant qu'accepteur d'électrons pour la respiration cellulaire. Ainsi, en condition aérobie, la réduction d'oxygène entraîne la formation d'eau tandis qu'en condition anaérobie, la réduction d'espèces oxydées du soufre (sulfates ou thiosulfates) entraîne la formation de sulfures. Les CVS produits à partir de composés organiques sulfurés sont majoritairement issus des acides aminés L-cystathionine, L-cystéine, L-homocystéine et L-méthionine sous l'action des enzymes méthionine γ -lyase, cystathionine γ -lyase, cystathionine β -lyase, L-méthionine aminotransférase et déméthiolase (Figure 12). [34]

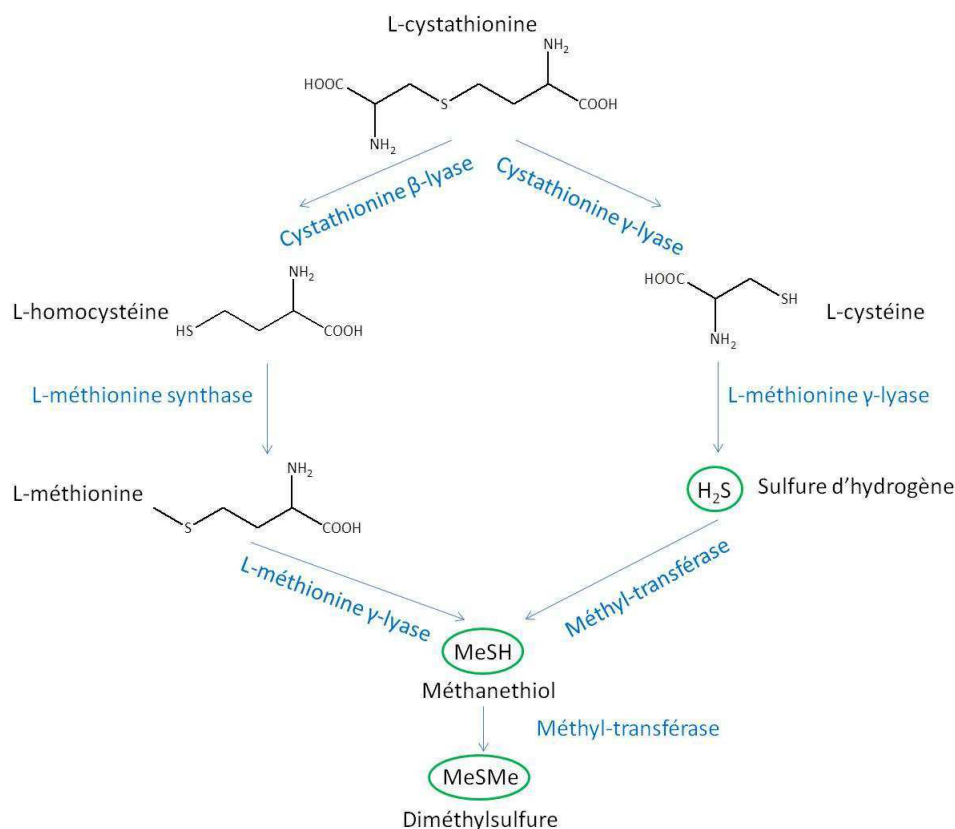


Figure 12 : Mécanismes de synthèse de composés volatils sulfurés à partir d'acides aminés. [34]

La L-Méthionine γ-lyase est une enzyme qui catalyse la γ-élimination de la L-méthionine pour former du méthanethiol, de l'ammoniac et de l'α-cétobutyrate. Cette enzyme catalyse également la β-élimination de la L-cystéine (S-substituées ou non) (Figure 13).

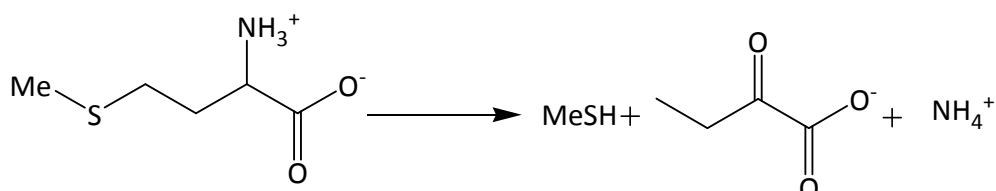


Figure 13 : Décomposition de la L-méthionine en méthanethiol, α-cétobutyrate et ammoniac sous l'action d'enzyme L-Méthionine γ-lyase [34]

La L-Méthionine γ-lyase est produite par *Pseudomonas putida*, *Entamoeba histolytica*, *Trichomonas vaginalis* et *Citrobacter freundii*. [100] Dans les expériences de Drotar *et al*, [101] la production de méthanethiol par *Pseudomonas* varie de 488 à 3613 molécules.min⁻¹.cellule⁻¹.(mL headspace)⁻¹. L'activité d'enzymes thiol méthyltransférases sur des substrats sulfurés permet la détoxification de H₂S en entraînant la formation de composés volatils sulfurés et méthylés comme MeSH. [101]

Jusqu'à présent, H₂S n'était considéré que comme un sous-produit du métabolisme microbien. Pourtant, il semblerait qu'il ait des propriétés physiologiques, notamment de protection et de résistance contre les antibiotiques. [102] Comme le monoxyde d'azote (NO), H₂S protège du stress oxydatif généré par les antibiotiques en protégeant les cellules

de la réaction de Fenton (altération de l'ADN) et en favorisant l'activité des enzymes catalase et superoxyde dismutase qui dégradent les peroxydes (ROS, *reactive oxygen species*). [102] Les récentes études de Fu *et al.* [103] ont montré qu' H₂S intervient également comme régulateur de production d'énergie dans les cellules mammifères quand la source d'oxygène est insuffisante. En d'autres termes, H₂S soutient la production d'ATP (adénosine-5'-triphosphate) dans des conditions hypoxiques.

I.2. Généralités sur le sulfure d'hydrogène

Le sulfure d'hydrogène (H₂S) est un gaz incolore produit en grande quantité par les activités industrielles comme le raffinage du pétrole et l'exploitation du gaz naturel. Ce dernier peut contenir jusqu'à 30% en masse d'H₂S. [104] Le traitement d'eaux usées, la tannerie, l'industrie papetière et l'agriculture sont également d'importants producteurs d'H₂S. Au-delà de la nuisance olfactive, H₂S a une odeur d'œuf pourri, il est nécessaire d'en contrôler les teneurs car il est rapidement absorbé via les voies respiratoires et a des effets neurotoxiques. Le nez humain est capable de détecter des concentrations autour de 0,01 et 0,5 ppm. [105] Une exposition prolongée à forte concentration à 100 ppm entraîne une paralysie du nerf olfactif et au-delà de cette concentration, une paralysie respiratoire survient, entraînant l'asphyxie et la mort. [106] En effet, l'inhalation d'H₂S provoque l'inactivation d'enzymes clés comme la cytochrome C oxydase, la phosphatase alcaline et l'anhydrase carbonique. [107] L'Institut National de Recherche et de Sécurité pour la prévention des accidents du travail et des maladies professionnelles (INRS) impose donc des valeurs d'exposition à ne pas dépasser. La valeur moyenne d'exposition (VME) sur 8 heures est 5 ppm et la valeur limite d'exposition (VLE) sur 15 minutes de 10 ppm. [105]

Cependant, H₂S semble aussi jouer un rôle dans les fonctions biologiques. En effet, quand il est présent à des concentrations allant du nano- au micromolaire, H₂S est impliqué dans la régulation du tonus vasculaire, la contraction du myocarde, la neurotransmission et la sécrétion d'insuline. [108] De plus, des concentrations micromolaires d'H₂S ont été observées dans le cerveau et le sang humain. [109] H₂S est également produit sous l'action enzymatique de bactéries sulfato-réductrices se trouvant dans la flore buccale, intestinale ou encore dans les eaux stagnantes. H₂S est considéré comme un biomarqueur de maladies comme l'hypertension pulmonaire, la maladie d'Alzheimer et la cirrhose du foie. [110] La détection de composés volatils soufrés (CVS) caractéristiques de bactéries pathogènes participe à l'établissement d'un diagnostic. Les bactéries responsables de maladies parodontales comme *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* et *Treponema denticola* produisent de grandes quantités de MeSH qui se retrouvent dans l'haleine des patients. [34] D'autres bactéries comme *Citrobacter freundii* et *Salmonella* produisent H₂S et MeSH.

L'intérêt pour le dosage d'H₂S à faibles concentrations ne cesse de croître car il trouve des applications dans de nombreux domaines comme l'évaluation de la qualité de l'air (nuisance olfactive près des usines ou des étangs), le rendement de certains procédés

catalytiques (H_2S est un poison de catalyseur), [111] la sécurité (sur les plateformes pétrolières), l'étude de la mauvaise haleine (halitose), ou encore la veille sanitaire (présence de salmonelles).

II. Méthodes de détection de H_2S et MeSH : Etat de l'art

Plusieurs méthodes analytiques comme la chromatographie en phases liquide et gazeuse, [112] ont été mises au point pour la détection de CVS. Ces méthodes sont généralement chronophages et nécessitent une préparation d'échantillon, un équipement coûteux ainsi qu'un technicien qualifié. Par exemple, l'analyseur MEDOR de la société Chromatotec [113], consiste en un couplage de chromatographie gazeuse à la détection en FID et coûte 25000€ HT. Or, aujourd'hui, les nouveaux capteurs visent la haute sensibilité, la rapidité de réponse, la facilité d'emploi et le bas coût. La plupart d'entre eux repose sur les semi-conducteurs à base d'oxydes métalliques dont la variation d'impédance indique la concentration. Les méthodes optiques sont séduisantes car elles allient sensibilité, simplicité, bas coût et facilité d'utilisation. [109] Un des enjeux lors de la détection d' H_2S est la précision de la mesure. En effet, de nombreux articles mentionnent la perte de sulfure pendant la calibration et l'analyse en elle-même. H_2S est un gaz qui s'adsorbe facilement sur les parois de la verrerie, [114,115] à la surface de solides lors de la formation de précipité. De plus, les sulfures (H_2S , MeSH) s'oxydent facilement à l'air. Ainsi, des diminutions de concentrations de 15% peuvent être observées au bout de 40 minutes après dissolution de HS^- dans des solutions de soude. [116] Le méthaneithiol est également difficile à mesurer car il s'oxyde rapidement en diméthyl disulfure (Me-S-S-Me). [101]

II.1. Capteurs électrochimiques

Aujourd'hui, Les détecteurs d' H_2S commerciaux reposent principalement sur deux techniques : les oxydes métalliques semi-conducteurs et les méthodes électrochimiques. [117] Ces dernières sont avantageuses car elles sont sensibles, permettent de travailler à température ambiante et les montages peuvent être miniaturisés. Elles consistent à déterminer la concentration d' H_2S d'après les transferts d'électrons qui ont lieu en solution lors de réactions d'oxydoréduction dans la cellule électrochimique contenant trois électrodes (Figure 14).

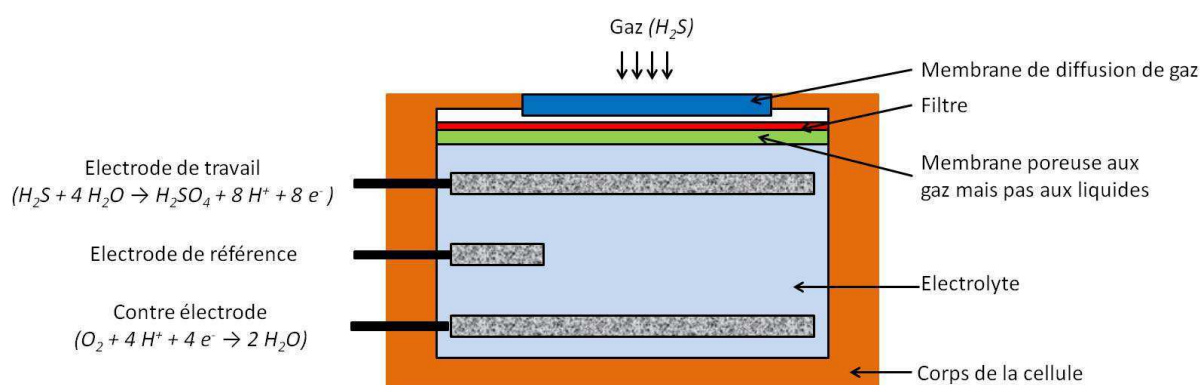


Figure 14 : Schéma de principe d'un détecteur électrochimique [117]

Ainsi, la société Cairpol [118] commercialise un détecteur d'H₂S, le Cairclip, qui est basé sur la mesure du gaz dissous et dont la durée de vie est d'un an (298€ l'unité). Ce capteur n'est pas sélectif car il détecte à la fois H₂S et le méthanthiol entre 10 ppb et 1 ppm. La société Alphasense utilise la même méthode pour ses capteurs dont le modèle portable H2SHA détecte entre 30 et 250 ppb en moins de 30 secondes (50€ l'unité). [119] La microélectrode Arrow H₂STM (1592 \$), commercialisée par les laboratoires LAZAR, mesure sélectivement jusqu'à 100 nM d'H₂S dans des volumes aussi faibles que la dizaine de microlitre. [120] Bien que le marché propose une multitude de capteurs, chacun présente des avantages et des inconvénients. [121] La détection par électrochimie se déroule en solution et nécessite un électrolyte support. Pour remédier au manque de sélectivité de ces méthodes, les capteurs sont équipés de membranes perméables souvent à base de polymères. Dans les travaux de Jeroschewski *et al.*, [122] la détection d'H₂S est réalisée grâce à l'intermédiaire du couple oxydo-réducteur ferri/ferrocyanure : ([Fe(CN)₆]³⁻ / [Fe(CN)₆]⁴⁻). H₂S dissous traverse la membrane de polydiméthylsiloxane (PDMS) et réagit avec une solution de ferricyanure. Il est alors oxydé en soufre élémentaire et l'ion ferrocyanure est formé. Ce dernier est réoxydé à l'électrode de travail, créant un courant qui est directement proportionnel à la quantité d'H₂S dissous. (Figure 15(a)) Les méthodes électrochimiques existantes en solution ne sont pas transposables à la détection d'espèces gazeuses. En effet, l'air n'est pas conducteur. Certains auteurs comme Schiavon *et al.* s'affranchissent du support électrolytique en utilisant un support poreux et conducteur qui sert à la fois d'électrode de travail et de couche sensible (Figure 15(b)). Une limite de détection de l'ordre de 45 ppb pour un temps de réponse de 0,5 seconde est atteinte. [123] La formation de bulles de gaz au niveau de la membrane entraîne, cependant, des résultats non reproductibles. [115]

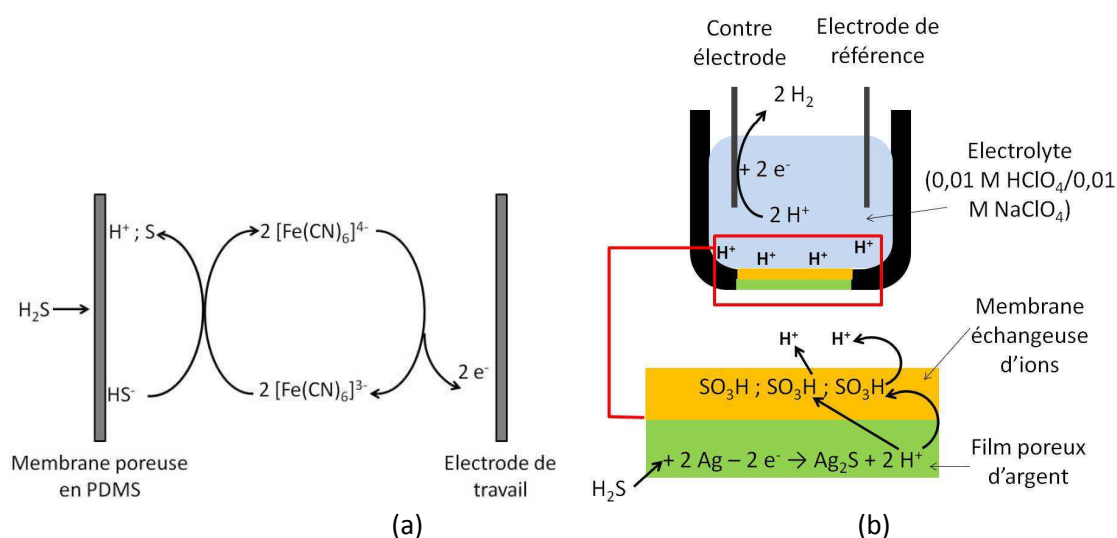


Figure 15 : (a) schéma de principe de la détection électrochimique d'H₂S dissous via le couple oxydo-réducteur ferri/ferrocyanure. [122] (b) schéma de principe de la détection électrochimique de H₂S gazeux en utilisant une membrane de Nafion poreuse recouverte d'argent. [123]

Les capteurs semi-conducteurs à base d'oxydes métalliques, souvent appelés MOS, sont utilisés dans les nez électroniques commerciaux (nez FOX et Gemini de la société AlphaMOS). Ils détectent H₂S en phase gazeuse et utilisent son affinité pour des oxydes comme le dioxyde d'étain (SnO₂), l'oxyde de zinc (ZnO), le dioxyde de titane (TiO₂), l'oxyde de fer III (Fe₂O₃), le trioxyde de tungstène (WO₃) et l'oxyde d'indium III (In₂O₃). [124,99] En s'adsorbant à la surface du MOS, le gaz est oxydé et les charges ainsi créées participent à la formation d'un signal de transduction : le courant électrique. Ces nez sont sensibles mais encombrants et chers (FOX : 80000€, Gemini : 50000€). Comme les nanotubes de carbone présentent un grand rapport surface/volume, des nanotubes d'oxydes métalliques sont aussi étudiés pour des applications de capteurs gaz. [125,126] A ce jour, les capteurs utilisant les nanotubes de carbone mentionnés dans la littérature peuvent être sélectifs mais leur limite de détection est élevée (50 ppm H₂S, 200 ppm NH₃). [61]

II.2. Méthodes de détection optique

Parmi les méthodes de détection les plus attractives, les méthodes optiques présentent l'avantage d'une transduction directe et ne nécessitent pas beaucoup d'instrumentation. Une interprétation visuelle selon l'intensité de la couleur ou de la fluorescence permet une évaluation qualitative de la teneur en H₂S et la mesure précise de ces données une évaluation quantitative. Il existe différents types de détection optique. La fluorescence et la spectrophotométrie UV-visible sont celles qui nous intéressent le plus.

II.2.1. Détection par formation d'un précipité

Dans les tests biochimiques, type galerie API 20E, la production d'H₂S par les micro-organismes est mise en évidence, en solution, par précipitation avec des ions ferreux (Fe²⁺) ou ferriques (Fe³⁺) pour donner un solide noir (FeS ou Fe₂S₃ respectivement). Cette méthode a été transposée en phase gazeuse en mettant en présence d'H₂S_(g), des ions métalliques imprégnés sur des bandelettes de papier. [127] Cette méthode est assez sensible et les auteurs, aujourd'hui, explorent différents supports solides (Tableau 5). En effet, H₂S précipite avec l'acétate de plomb pour donner un solide noir [128] et avec les ions cadmium (II) pour donner un solide jaune [129] qui est aussi fluorescent. [81] L'équipe d'Edison [26] a mis au point un indicateur colorimétrique d'H₂S en incorporant du sulfate de fer (II) (FeSO₄) dans une matrice de chitosan (polysaccharide obtenu par désacétylation partielle de la chitine, Figure 16). La formation de précipité noir (FeS) est suivie par colorimétrie et permet d'obtenir une limite basse de détection de 100 ppm d'H₂S. Des films minces sont aussi préparés comme le colloïde d'argent déposé en film mince sur du PVC par Hawkins *et al.* En s'oxydant en sulfate d'argent en présence d'H₂S, le colloïde jaune devient bleu noir. Ce

phénomène est quantifié en suivant l'évolution d'absorbance à $\lambda = 420 \text{ nm}$. [130] Dans l'industrie, des badges sont portés par le personnel pouvant se trouver en présence d' H_2S . Les badges CHROMair commercialisés par la société Morphix technologies, [131] détectent entre 1 et 240 ppm d' H_2S dans l'air ambiant et coûtent 10\$ l'unité. Ces dispositifs changent de couleur en présence d' H_2S , lors de la précipitation de sels métalliques adsorbés sur une membrane. [132]

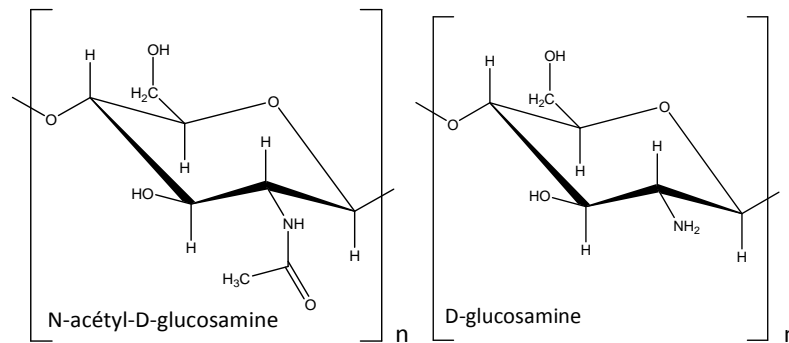


Figure 16 : Le chitosan est un polysaccharide composé d'unités N-acétyl-D-glucosamine et D-glucosamine. Il est obtenu à partir de la désacétylation de la chitine, un polymère de N-acétyl-D-glucosamine.

II.2.2. Utilisation de biocapteurs:

L'utilisation de bactéries génétiquement modifiées semble une méthode séduisante pour la détection de sulfures. Maeda *et al.* [133] ont déplacé un gène chez la bactérie marine *Rhodovulum sulfidophilum* afin qu'elle devienne rouge lorsque son milieu de culture aqueux contient du diméthylsulfure ou du diméthylsulfoxyde. Ce phénomène est dû à la formation d'un caroténoïde appelé sphéroidénone, de couleur rouge. 3 μM de diméthylsulfure ou de diméthylsulfoxyde peuvent être détectés au bout d'un jour, lorsque la bactérie entre en phase exponentielle de multiplication.

II.2.3. Détection par fluorescence

La détection d' H_2S par fluorescence peut être utilisée dans deux cas : l'apparition ou la disparition d'un signal de fluorescence. L'utilisation de composés non fluorescents dont l'interaction avec H_2S provoque la libération d'espèces fluorescentes est souvent rapportée. Différents auteurs ont obtenu des limites de détection basses en phase gazeuse avec des composés non fluorescents tels que l'acétate de mercure (II) de fluorescéine tétraoctyl ammonium (15 ppm, [134]) et le 2,2'-pyridylbenzimidazole de mercure (II) (200 ppb, [135], Figure 17).

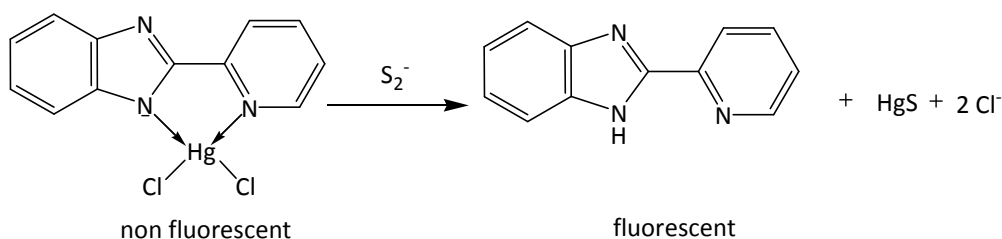


Figure 17 : Mécanisme proposé pour la détection d'H₂S grâce à la libération de 2,2'-pyridylbenzimidazole fluorescent. [135]

L'inhibition de fluorescence correspond au suivi de la disparition du signal de fluorescence lorsque l'analyte est détecté. C'est cette méthode qu'ont utilisé Choi *et al.* [136] en préparant un complexe fluorescéine-acétate de mercure, dont la fluorescence diminue lorsqu'H₂S, dissous en solution, interagit avec l'acétate de mercure (Figure 18). Bien que cette méthode soit d'une grande sensibilité, elle n'est pas sélective vis-à-vis de H₂S et n'importe quelle molécule contenant une fonction thiol peut inhiber la fluorescence du complexe.

Pour une plus grande facilité d'utilisation du capteur, les laboratoires cherchent à intégrer la molécule-sonde dans des matrices solides. Ainsi, Xu *et al.* [106] ont incorporé des nanoparticules de CdSe/CdS fluorescents dans du polydiméthylsiloxane (PDMS) permettant ainsi de détecter jusqu'à 10 ppm de H₂S, en phase gazeuse, en 1 minute toujours par inhibition de fluorescence. Le phénomène étant réversible, le capteur est réutilisable plusieurs fois. Un support silice peut être préféré au support polymère pour améliorer la durée de vie du capteur. La thionine, un indicateur fluorescent, a été immobilisée sur silice par Shahriari *et al.* [137]. La diminution de la fluorescence observée à $\lambda = 625$ nm pour une excitation à $\lambda = 580$ nm indique la présence d'H₂S dans la solution de soude auquel le film est exposé. Le signal est détecté dans une fourchette de 50 à 100 ppm d'H₂S dissous.

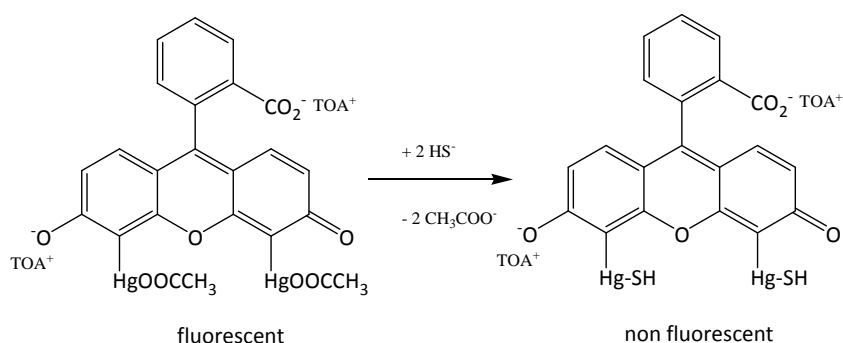


Figure 18 : mécanisme proposé pour la détection d'H₂S par inhibition de fluorescence de l'acétate de mercure fluorescéine tétraoctylammonium [136]

L'avantage de l'apparition de fluorescence est d'obtenir un signal clair, contrairement à l'inhibition. En effet, la disparition de la fluorescence peut aussi avoir comme origine une désactivation de l'état excité par collisions non réactives avec les nombreux polluants présents dans l'air. La détection en fluorescence est très sensible et elle n'est intéressante qu'à condition que la détection d'H₂S ait lieu par apparition de fluorescence. Le composé fluorescent formé doit avoir un bon rendement quantique de fluorescence. Cependant, les

complexes présentés ici ne sont pas sélectifs vis-à-vis d'H₂S et d'autres composés possédant une fonction thiol peuvent être détectés.

II.2.4. Détection par absorption dans l'UV-visible :

La détection par absorption dans l'UV-visible présente l'avantage de pouvoir suivre visuellement la détection d'H₂S. Comme pour la fluorescence, il existe des moyens de détection basés sur l'apparition ou la disparition d'une coloration du capteur. Un exemple de détecteurs d'H₂S utilisant le principe de décoloration est donné par Rodriguez-Fernandez *et al.* [138] avec la silice dopée au 2,6-dichlorophénolindophénol (DCPIP). Ce composé, réduit par H₂S(g), se décolore et la mesure de la perte de coloration permet la détection de H₂S entre 10 ppb et 1 ppm d' H₂S dans l'haleine d'un patient. L'utilisation de toluidine bleue repose également sur la réduction de cet indicateur colorimétrique qui, en passant de bleu à incolore, permet la détection d'H₂S en solution (Figure 19). [139]

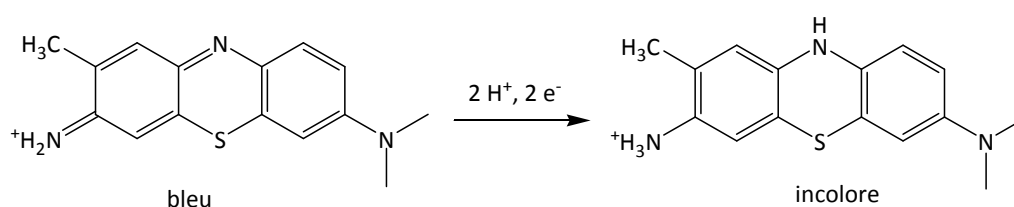


Figure 19 : Réduction de la toluidine bleue par H₂S pour former sa forme réduite incolore [139]

Certains indicateurs colorimétriques redox possèdent des formes oxydée et réduite toutes deux absorbantes dans le visible. C'est le cas de la résazurine (bleue sous forme oxydée) qui, réduite en résorufine par H₂S, devient rose (Figure 20). Le suivi de l'absorbance à $\lambda_{\text{abs}} = 605 \text{ nm}$ ont permis à Safavi *et al.* [140] de mettre au point une méthode sélective vis-à-vis d'H₂S.

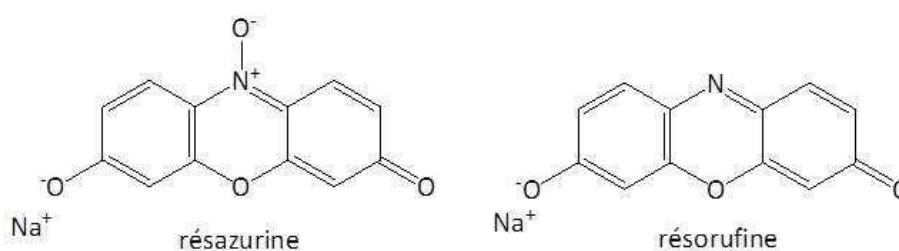


Figure 20 : structures de la résazurine bleue et de sa forme réduite, la résorufine rose. [139]

Le réactif d'Ellman est couramment utilisé pour la détection de protéines contenant une fonction thiol [141]. L'acide 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoïque) noté DTNB réagit avec les thiols en formant un produit secondaire : l'acide 2-nitro-5-thiobenzoïque (TNB) qui absorbe fortement à 412 nm ($\epsilon_{412\text{nm}} = 15\,500 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, Figure 21). [142] Adsorbé sur un film de sol-gel, il permet de mettre en évidence l'activité d'inhibiteurs d'enzymes. [143] Cependant, la réaction n'est pas sélective et le réactif d'Ellman détecte à la fois les thiols, les thiosulfates et les sulfures, ce qui en fait un détecteur de produits soufrés totaux en solution. [142]

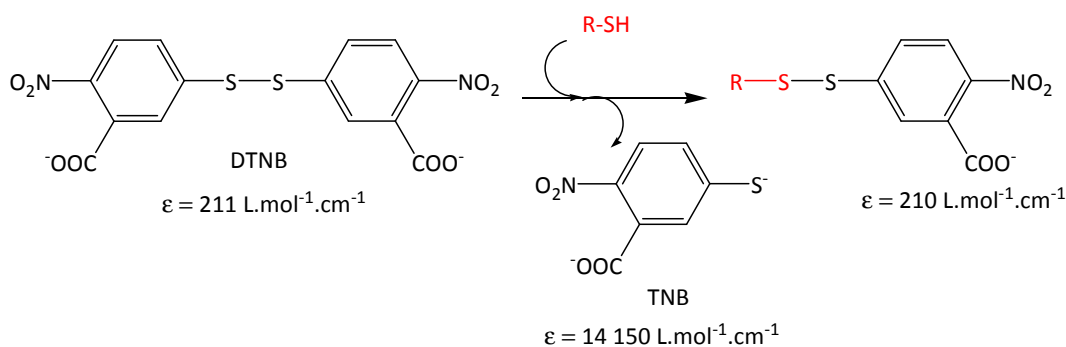


Figure 21 : Détection de thioalcanes par le réactif d'Ellman [144]

Le cuivre est souvent utilisé pour la détection d' H_2S car ce dernier réduit Cu^{2+} en Cu^+ . [145] Les ions cuivre peuvent former des complexes dont la longueur d'onde d'absorption change suivant l'état d'oxydation du cuivre (Tableau 5). Wallace *et al.* [146] ont exploité cette propriété en incorporant des chromophores à base de cuivre à hauteur de 3% dans des films minces de polymères (polysiloxane avec des fonctions acrylates). En réagissant avec $\text{H}_2\text{S}_{(\text{g})}$, le complexe à base de Cu^{2+} [$\text{Cu}(\text{acac})(\text{dpph})$](NO_3) (acac = acétylacétone et dpph = 4,7-diphényl-1,10-phénanthroline) (Figure 22) absorbant à 350 nm est réduit en un complexe de Cu^+ et une nouvelle bande d'absorption apparaît avec un maximum centré à 464 nm. Ces films permettent de détecter 10 ppm d' H_2S gazeux en 10 minutes. Les auteurs mentionnent de possibles interférences sans plus de précisions.

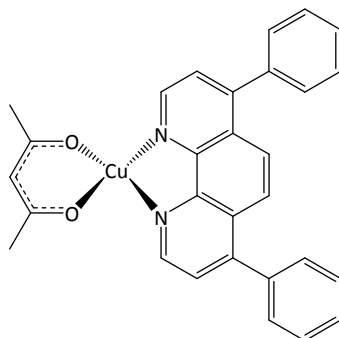
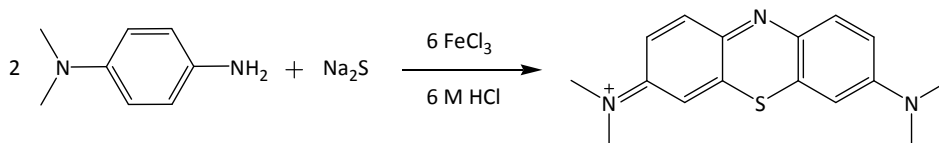


Figure 22 : structure du complexe de cuivre (II) préparé par Wallace *et al.* [146]

Rodriguez-Fernandez [147] aborde une approche similaire, toujours en phase gazeuse, en utilisant le complexe de néocuproïne de cuivre (II) (vert) pour détecter H_2S en formant le complexe de néocuproïne de cuivre (I) (jaune). Quant au détecteur étudié par Davidson *et al.*, [148] le changement de couleur de jaune à noir est provoqué par la libération de 1,1,1,5,5,5-hexafluoropentan-2,4-dione (Hhfac) par réaction d' $\text{H}_2\text{S}_{(\text{g})}$ ou $\text{MeSH}_{(\text{g})}$ avec la cycloocta-1,5-diène-1,1,1,5,5,5-hexafluoropentan-2,4-dionatocuire (I). Cette méthode permet de détecter 10 ppb de H_2S ou de MeSH , sans distinction. L'ensemble des réactions de détection colorimétrique implique cependant l'utilisation d'ions Cu^{2+} , connus pour leur toxicité, [149].

Kuban *et al.* [159] ont proposé en 1992 la détection d' H_2S en solution par formation de bleu de méthylène (MB) en faisant réagir une molécule d' H_2S avec deux molécules de N,N-diméthylparaphénylènediamine (DMPD) préalablement oxydées par le chlorure de fer

(III) (FeCl_3) (Équation 1). Cette méthode a été précédemment décrite par Emil Fischer en 1883. [176]



Équation 1. Equation bilan de la formation de bleu de méthylène par réaction d'un anion sulfure sur deux molécules de DMPD. [159]

Le bleu de méthylène absorbe dans le visible avec un maximum centré à $\lambda = 668 \text{ nm}$ sous sa forme cationique MB^+ et à $\lambda = 750 \text{ nm}$ sous sa forme protonée MBH^{2+} (Figure 23). Cette méthode permet de détecter spécifiquement H_2S avec une limite de détection inférieure au $\mu\text{g/L}$. Plus récemment, en 2000, Rees *et al.* ont suggéré l'utilisation de N,N-diéthyl-para-phénylènediamine (DEPD). [150] Cette molécule serait plus stable que la DMPD et le produit de réaction qui en résulte, le bleu d'éthylène (EB), possède un coefficient d'extinction molaire plus élevé que celui du bleu de méthylène ($\epsilon_{\text{EB},670\text{nm}} = 9,42 \cdot 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). [151]

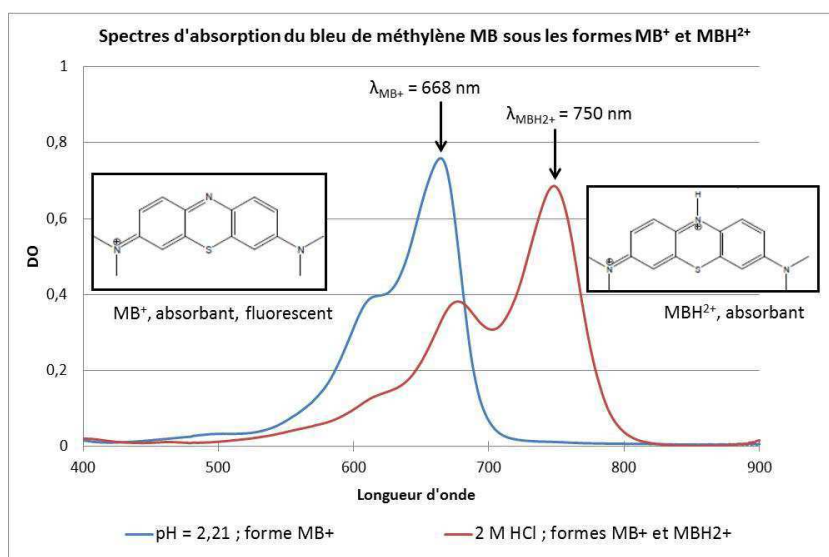


Figure 23 : Spectres des formes cationique et protonée du bleu de méthylène.

En 2012, l'équipe de F. Yu a modifié une cyanine en lui apportant une fonction azoture (Cy-N_3) qui est réduite en fonction amine (Cy-NH_2) par H_2S dissous en phase liquide (Figure 24). [108] La réaction a lieu à $\text{pH} = 7,4$ tamponné par de l'acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthanesulfonique (HEPES) et est utilisée pour détecter la production d' H_2S au sein de cellules vivantes. La réduction par H_2S de ladite cyanine entraîne une modification des spectres d'absorption et de fluorescence. Les valeurs des coefficients d'extinction molaire de Cy-N_3 et de Cy-NH_2 sont élevées ($\epsilon_{610\text{nm}} = 94\,000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ et $\epsilon_{660\text{nm}} = 130\,000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ respectivement) et celles de leur rendement quantique de fluorescence semblent intéressantes ($\phi(\text{Cy-N}_3, \lambda_{\text{ex}} = 710 \text{ nm}) = 0,11$ et $\phi(\text{Cy-NH}_2, \lambda_{\text{ex}} = 750 \text{ nm}) = 0,12$ respectivement).

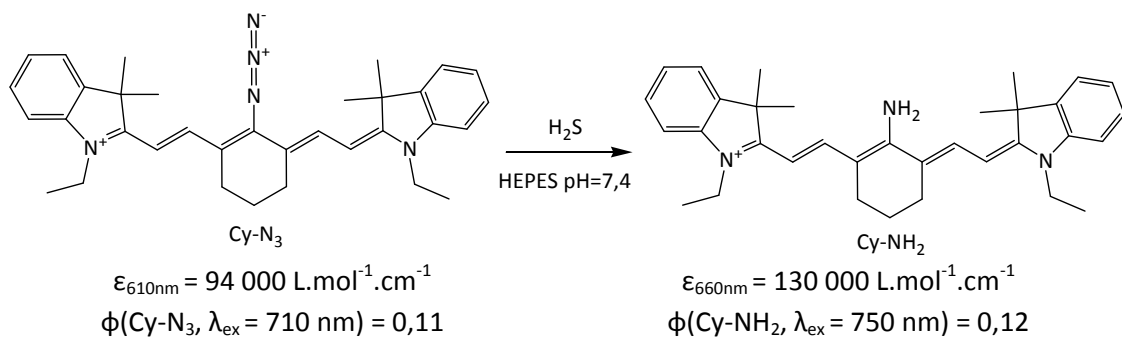


Figure 24 : Détection d'H₂S par réduction de la fonction azoture en fonction amine d'une cyanine.
[108]

L'ensemble des méthodes pour la détection de sulfures décrites ci-dessus est rassemblé dans le Tableau 5. Les avantages et les inconvénients de chaque méthode ont été répertoriés afin de choisir la plus pertinente qui permette la détection de sulfure d'hydrogène émis par des bactéries.

Méthode de détection	Système de détection	seuil de détection	Avantage	Inconvénient	Référence
Electrochimique	Membrane de Nafion recouverte d'un film d'argent	45 ppb	Sensibilité	La diffusion du gaz à travers la membrane est lente	Schiavon <i>et al.</i> [125]
	Microélectrode sélective envers H ₂ S	100 nM	Sensibilité, faible volume 10 µL	Dispositif coûteux (1592 \$)	LAZAR Research Lab [122]
	Bandelette imprégnée d'AgNO ₃	1 ppb-50 ppm	Bas coût, Sensible	Influencé par l'humidité	Natusch <i>et al.</i> [131]
	Bandelette imprégnée acétate de Pb	2 ppb en 1 H	Bas coût, Sensible	instable à la lumière, pb d'humidité	Edison <i>et al.</i> [135]
Formation d'un précipité	Matrice chitosan dopée FeSO ₄	100 ppm en 30 s	Matrice biodégradable	Peu sensible	Hawkins <i>et al.</i> [136]
	Film mince de colloïde d'argent	100 ppb en 1 H 1 ppm en 10 min	Sensible	Influencé par l'humidité	
	Membrane imprégnée de sels métalliques (badges CHROMAïr)	1 ppm	Sensibilité Peu coûteux (10\$ le badge)	Mesure qualitative, non quantitative	Morphix technologies [137]
Fluorescence	Fluoresceine modifiée à l'acétate de mercure	15 ppm en 2-5 s	Stable Réponse rapide	Le support PVC apporte une fluorescence intrinsèque	Choi <i>et al.</i> [140]
	Complexe d'ions mercure Hg ²⁺ et de 2,2'-Pyridylbenzimidazole	4-200 ppb	Sensible		Rodriguez-Fernandez <i>et al.</i> [141]
	Fluoresceine modifiée à l'acétate de mercure	0,07-4,4 µM	Système portable		Choi <i>et al.</i> [142]
	Nanoparticules de CdSe	10 ppm en 1 min	Réversible	Inhibition de fluorescence, dépend du pH, Non sélectif	Xu <i>et al.</i> [108]
	Thionine fluorescente	50-100 ppm	Support sol-gel	Inhibition de fluorescence	Shahriari <i>et al.</i> [143]
	Silice + 2,6-dichlorophénolindophénol	10 ppb	Support sol-gel	Décoloration de la sonde	Rodriguez-Fernandez <i>et al.</i> [144]
	Toluidine bleue	0,28-1,7 µg/mL		Peu sensible, Peu sélective Décoloration de la sonde	Mousavi <i>et al.</i> [145]
	Résazurine oxydée	50 ng/mL	Sensible	Interférence avec gaz réducteurs	Safavi <i>et al.</i> [146]
	Complexe de cuivre (II)	10 ppm en 2 min	film mince de matrice polymère	Réagit avec des interférents	Wallace <i>et al.</i> [152]
	Complexe de cuivre (II)	250 ppb	Pas d'interférents dans l'haleine	Détection non réversible	Rodriguez-Fernandez <i>et al.</i> [153]
Absorption dans l'UV-visible	Complexe de cuivre (I)	10 ppb	Insensible à l'humidité	Détecte aussi le méthanol	Davidson <i>et al.</i> [154]
	Formation de bleu de méthylène	<µg/L	Sélectif vis-à-vis d'H ₂ S, Sensible MB ³⁺ est fluorescent	MBH ²⁺ n'est pas fluorescent Détecte aussi le méthanol	Kuban <i>et al.</i> [165]
	Formation de bleu d'éthylène	5 µg/L	Sélectif vis-à-vis d'H ₂ S, Sensible	Détecte les thiols	Singh <i>et al.</i> [157]
	Solution de cyanine comportant un groupement azide (Cy-N ₃)	0,1 µg/L	EB plus absorbant que MB	Détecte les thiols	Rees <i>et al.</i> [156]
		Non indiquée	Sensible, Fortement absorbant et fluorescent (φ = 0,12)	Cy-N ₃ non disponible commercialement	Yu <i>et al.</i> [110]

Tableau 5 : Tableau récapitulatif des méthodes de détection relevées dans la littérature

II.3. Choix de la molécule sonde

Notre stratégie consiste à détecter le sulfure d'hydrogène émis par des bactéries. Les concentrations d'H₂S en phase gazeuse que l'on cherche à mesurer sont de l'ordre de la centaine de ppb. [152] Souhaitant privilégier la détection en phase gazeuse, les méthodes électrochimiques faisant impérativement appel à une réaction en solution sont écartées. La précipitation en solide coloré de sels métalliques en présence d'H₂S est sensible mais l'humidité représente un interférent majeur (Tableau 5). De plus, la plupart des sels de métaux utilisés sont toxiques (Pb²⁺, Cd²⁺, Cu²⁺ ...). La détection en fluorescence n'est pas intéressante lorsqu'elle s'appuie sur une inhibition de signal. Les limites de détection sont d'ailleurs moins satisfaisantes (10 ppm d'H₂S) que lorsque le signal de fluorescence apparaît (4 ppb). Les molécules sondes permettant de mettre en œuvre cette méthode contiennent du mercure et ne sont donc pas retenues.

Il pourrait être intéressant d'immobiliser des bactéries marines comme *Rhodovulum sulfidophilum* dans un sol-gel en vue de détecter le diméthylsulfure généré par *Salmonella*. L'incorporation de cellules vivantes dans un sol-gel est très complexe [153,154,155,156] d'autant plus que le temps de réponse de *Rhodovulum sulfidophilum* est d'une journée, ce qui reste trop long.

L'emploi d'indicateurs colorimétriques acide/base ou red/ox apporte une réponse qualitative rapide en présence d' H₂S. L'étude de la réduction de la résazurine en résorufine, composé rose, en solution est encourageante. Sensible (50 ng/mL), elle pourrait être transposée en monolithe à condition que d'autres COV réducteurs ne viennent interférer en formant également de la résorufine.

L'incorporation de Cy-N₃ dans une matrice sol-gel semble prometteuse pour une détection en absorption ou en fluorescence d'H₂S au vu des propriétés optiques du produit de détection. Cependant la molécule Cy-N₃ n'est pas disponible commercialement et il est nécessaire de la synthétiser.

Parmi toutes les méthodes décrites et résumées dans le Tableau 5, celle ayant retenu notre attention est la détection d'H₂S par formation de bleu de méthylène. Cette molécule absorbe dans le visible avec une bande d'absorption centrée à $\lambda = 666$ nm sous sa forme cationique MB⁺ et à $\lambda = 745$ nm sous sa forme protonée MBH²⁺ (Figure 23). Les deux formes présentent un coefficient d'extinction molaire élevé : $\epsilon_{666\text{nm},\text{MB}^+} = 74014 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ [157] et $\epsilon_{750\text{nm},\text{MBH}_2^+} = 63900 \pm 500 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ [158] ce qui permet d'obtenir une coloration même pour une faible concentration. De plus, le bleu de méthylène sous forme cationique émet une fluorescence centrée à $\lambda = 690$ nm pour une excitation à $\lambda = 640$ nm. Un choix entre une détection colorimétrique [159] et fluorescente [160] se présente à nous.

D'après différentes sources bibliographiques [159, 160 et 161], la réaction est rapide en solution ce qui correspond aux exigences du capteur qui doit détecter rapidement le composé pour des concentrations de l'ordre de la centaine de ppb. [152]

Enfin, la réaction de sulfure d'hydrogène sur la DMPD oxydée est une réaction spécifique. Seul H_2S permet de former du bleu de méthylène. La molécule sonde réagit également avec le méthanethiol ($MeSH$) mais c'est pour donner un produit rouge absorbant vers $\lambda_{abs} = 500 \text{ nm}$ qui n'a, à ce jour, pas été caractérisé. [162] Le diméthylsulfure ne réagit pas. [159] Il est donc possible de préparer un même capteur pour H_2S et $MeSH$.

Le bleu d'éthylène étant plus absorbant que le MB, on pourrait envisager d'utiliser la DEPD. Cependant, l'oxydation de la DMPD a beaucoup plus été étudiée et plusieurs articles décrivent déjà les sous-produits qui en sont issus. Entrant dans la préparation de colorants, elle a largement intéressé la communauté scientifique travaillant pour l'industrie de la photographie couleur [163] et le domaine des colorations capillaires. [164] Elle est également utilisée comme révélateur de présence de substances oxydantes aussi bien dans les systèmes biologiques [165,166] que dans les aliments (vins, jus de fruits, céréales). [167,168]

La méthode au bleu de méthylène est choisie pour la détection sélective de sulfure d'hydrogène en phase gazeuse. Sensible, cette méthode et les réactifs utilisés présentent l'avantage d'avoir été étudiés par la communauté scientifique.

III. Propriétés optiques et rédox du bleu de méthylène

III.1. Formes acido-basiques du bleu de méthylène

Le bleu de méthylène est une molécule tricyclique qui possède deux formes ioniques MB^+ et MBH^{2+} (Figure 25) dont la prédominance dépend du pH. La forme MB^+ prédomine à $pH > 0,29$; présente un maximum d'absorption à 668 nm et émet une fluorescence centrée à 690 nm pour une excitation à 640 nm. La forme MBH^{2+} prédomine à $pH < 0,29$; présente un maximum d'absorption à 750 nm et n'est pas fluorescente.

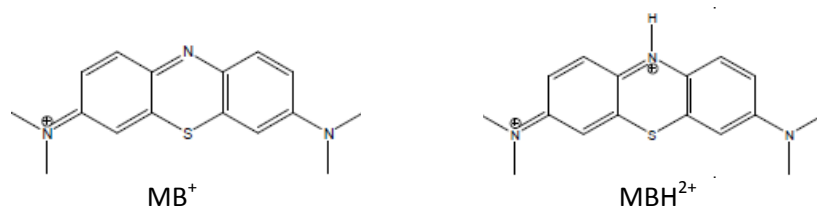
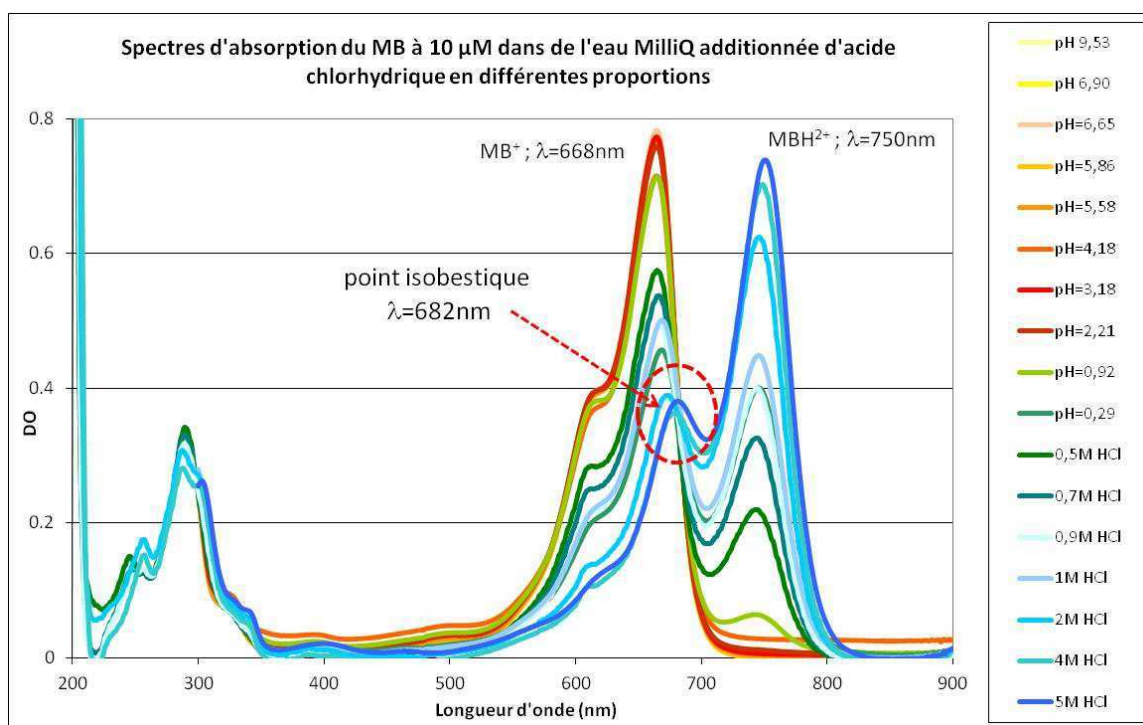


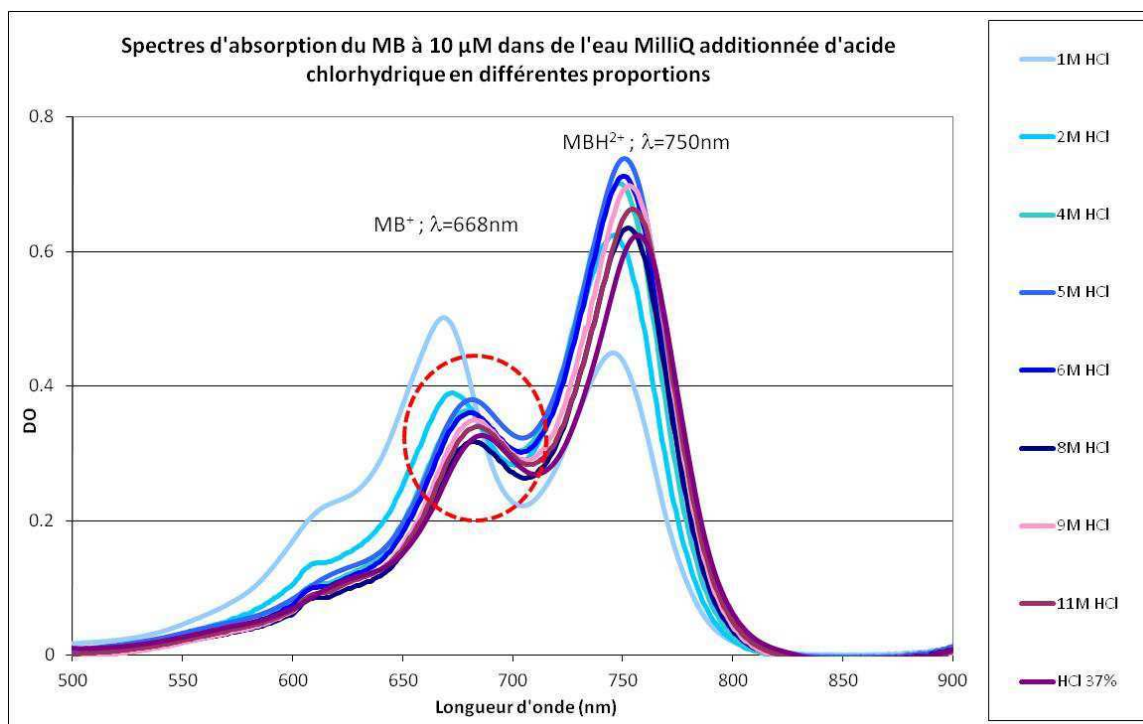
Figure 25. Structures du bleu de méthylène sous ses deux formes ioniques MB^+ et MBH^{2+}

III.2. Spectre UV-Visible du bleu de méthylène

Le spectre d'absorption UV-visible du bleu de méthylène a été acquis avec un spectrophotomètre CARY 300 (Agilent technologies) et des cuves en quartz suprasil de chemin optique $l = 1$ cm. Des solutions de concentration constante et égale à $10 \mu\text{M}$ de MB ont été préparées dans de l'eau MilliQ additionnée de différentes proportions d'acide chlorhydrique afin d'observer l'évolution du rapport des formes MB^+ et MBH^{2+} (Figure 26). On remarque la présence d'un point isobestique à 682 nm (définition d'un point isobestique en Annexe 7). A cette longueur d'onde, les deux espèces ont le même coefficient d'extinction molaire ϵ . Il semble que le bleu de méthylène se détériore en milieu très acide ; en effet au-delà de $[\text{HCl}] = 6 \text{ M}$, l'absorbance de MB diminue (Figure 26).



(a)



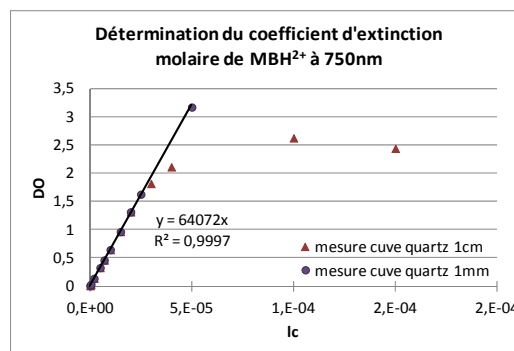
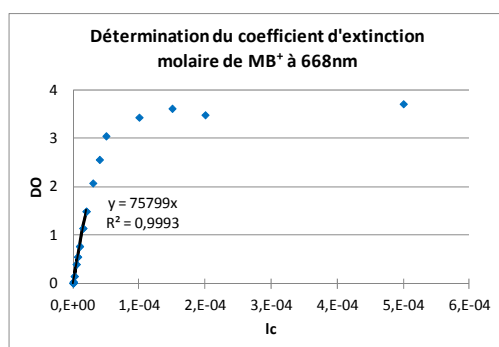
(b)

Figure 26 : Spectres de MB 10 μM dans des solutions aqueuses additionnées d'acide chlorhydrique. (a) Mise en évidence des deux formes du bleu de méthylène et du point isobestique à $\lambda = 682 \text{ nm}$; (b) Au-delà de 6 M HCl, les spectres du MB ne passent plus par le point isobestique : le MB est dégradé.

III.3. Coefficients d'extinction molaire des différentes formes du bleu de méthylène

Le coefficient d'extinction molaire de la forme MB^+ a été mesuré dans l'eau MilliQ à 668 nm (Figure 27). Il est de $75\,800 \pm 2500 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (Littérature : $73\,040 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ à 668 nm [157]).

Le coefficient d'extinction molaire de la forme MBH^{2+} a été mesuré dans HCl à 6 M à 750 nm (Figure 27). Il est de $64\,000 \pm 2200 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (Littérature : $63\,900 \pm 500 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ [158]). Le coefficient d'extinction molaire du MB au point isobestique, à 682 nm, vaut $32\,300 \pm 1500 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (Figure 27).



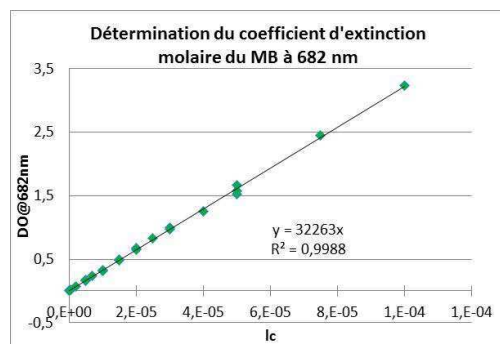


Figure 27: Détermination du coefficient d'extinction molaire de MB^+ , MBH^{2+} et au point isobestique

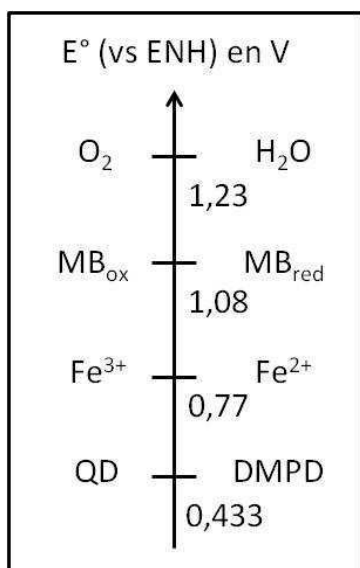
III.4. Rendement quantique de fluorescence du bleu de méthylène

Le rendement quantique de fluorescence du MB^+ a été calculé dans l'eau MilliQ et dans l'éthanol. L'analyse en émission de fluorescence est réalisée avec un spectrofluorimètre PERKIN ELMER LS 50 B équipé d'une lampe à Xénon. Les fentes d'émission et d'excitation sont réglées à 3 nm (ouverture minimale). La détection de l'émission de fluorescence est effectuée en mode « right angle » (RA). La référence choisie est la phtalocyanine de zinc tétrasulfonée (ZnPcTS) dans l'eau additionnée de 5% de pyridine. Cette molécule est choisie comme référence car elle émet une fluorescence dans les mêmes domaines de longueur d'onde que MB pour une même longueur d'onde d'excitation. Le rendement quantique de fluorescence de la ZnPcTS dans l'eau + 5% pyridine est connu [169] : $\Phi(\text{ZnPcTS}) = 0,32 \pm 0,03$. Les résultats obtenus sont les suivants (détails en Annexe 8) :

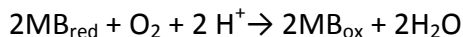
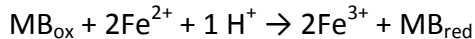
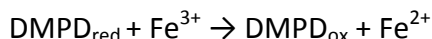
- ✓ Rendement quantique du bleu de méthylène dans l'eau : $0,032 \pm 0,015$.
(Littérature [170] : $\text{MB}(\text{eau}) = 0,02 \pm 0,002$).
- ✓ Rendement quantique du bleu de méthylène dans l'éthanol : $0,1 \pm 0,04$
(Littérature [171] : $\text{MB}(\text{EtOH}) = 0,04 \pm 0,02$).

III.5. Etude des formes oxydées et réduites du bleu de méthylène

Le bleu de méthylène est un indicateur rédox. Sa forme oxydée, formée lors de la détection de H_2S , est bleue. Sa forme réduite est incolore. [172, 173, 174] Le comportement du bleu de méthylène a été étudié dans les conditions d'exposition afin de s'assurer qu'il ne sera pas réduit après sa formation. En effet, les ions FeCl_2 issus de l'oxydation par les ions FeCl_3 de la DMPD pourraient réduire le MB (Figure 28). Cependant, l'expérience a montré que le MB_{red} est aussitôt réoxydé en MB_{ox} (couleur bleue) par l'oxygène de l'air. Par conséquent, la réduction du MB ne posera pas problème dans le cas de la détection d' H_2S .



Equations mises en jeu :



Potentils des espèces mises en jeu (vs ENH) :

$$E^\circ(\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}) = 1,23 \text{ V} ;$$

$$E^\circ(\text{MB}_{\text{ox}}/\text{MB}_{\text{red}}) [172] = 1.08 \text{ V à pH} = 6$$

$$E^\circ(\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}) = 0.77 \text{ V}$$

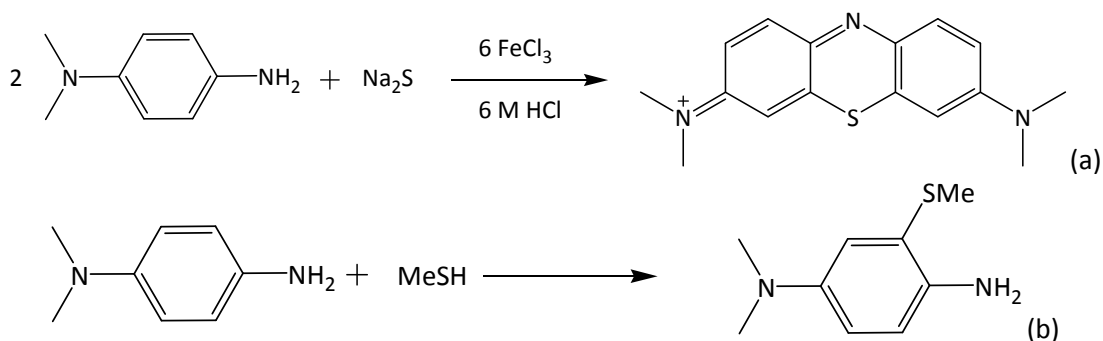
$$E^\circ(\text{DMPD}_{\text{ox}}/\text{DMPD}_{\text{red}}) [175] = 0.433 \text{ V à pH} = 7$$

Figure 28 : Echelle de potentiels redox des espèces impliquées dans la synthèse du MB. L'ion ferreux (Fe^{2+}) peut réduire le MB en sa forme incolore qui peut être réoxydée par l'oxygène de l'air.

IV. Description du mécanisme de formation du bleu de méthylène

IV.1. Etat de l'art

La formation de bleu de méthylène à partir d' H_2S a été décrite pour la première fois en 1883 par Emil Fischer [176]. Deux molécules de N,N-diméthylparaphénylènediamine (DMPD) oxydées avec des ions ferriques (Fe^{3+}) réagissent avec une molécule de sulfure d'hydrogène pour donner du bleu de méthylène (MB) (Figure 29a). Cette réaction a depuis été largement étudiée. Un mécanisme comportant 7 étapes et impliquant 6 équivalents de FeCl_3 pour des réactions d'oxydation a été proposé en 1992 par Kuban [159] (Figure 30). La réaction est spécifique au sulfure d'hydrogène. Bien que les alcanethiols, comme le méthaneithiol, réagissent également avec la DMPD oxydée par FeCl_3 , le produit formé est rouge et absorbe autour de 500 nm. [162,177] Leur réponse n'interférera pas avec celle de H_2S (Figure 29b et c).



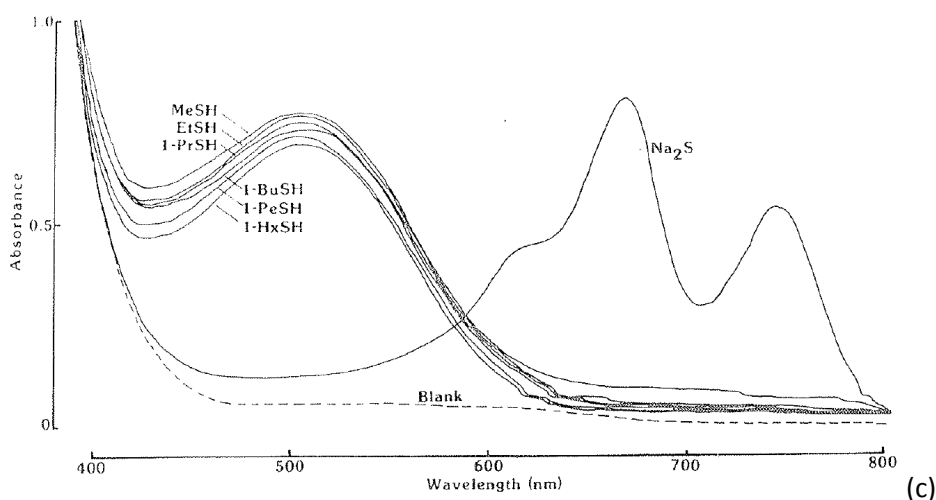


Figure 29 : (a) Equation bilan de la formation de bleu de méthylène (b) Equation bilan et structure probable proposée par Lawrence [177] pour la réaction avec le méthaneithiol (c) Spectres d'absorption de solutions de DMPD oxydée par FeCl_3 ayant réagi avec H_2S et des alcanethiols. [178]

Dans le même article, Kuban décrit **un radical cation comme étant l'intermédiaire réactionnel clé**. [159] Ce radical, appelé **Wurster's red (WR)** [179], est formé à partir de l'oxydation monoélectronique d'une molécule de DMPD (Figure 30).

Or, une étude en électrochimie menée par Lawrence *et al.* en 2000 [180] a montré que **c'est un autre composé, la quinonediimine (QD), qui est l'intermédiaire réactionnel**. La quinonediimine correspond à l'oxydation à deux électrons d'une molécule de DMPD (Figure 30). C'est une molécule très réactive qui s'hydrolyse facilement pour former de nombreux sous-produits (voir paragraphe IV.3.3.).

D'après la littérature, la réaction de formation du bleu de méthylène est sensible à de nombreux paramètres. En plus d'être sensible au pH, elle est influencée par l'ordre d'introduction des réactifs. En effet, si un temps d'attente trop long est observé entre le mélange de la DMPD avec Fe^{3+} et l'addition de Na_2S , le bleu de méthylène n'est pas formé. [159] Cette dernière observation laisse à prévoir l'existence d'espèce(s) intermédiaire(s) plus ou moins stables.

Ces constatations nous ont amenés à revisiter la réaction du DMPD menant au MB^+ en solution à divers pH, avec un intérêt plus particulier pour les espèces intermédiaires formées. Nous utiliserons à la fois les méthodes spectrophotométrique, électrochimique, photoélectrochimique ainsi que la résonance paramagnétique électronique pour mettre en évidence et caractériser ces espèces formées.

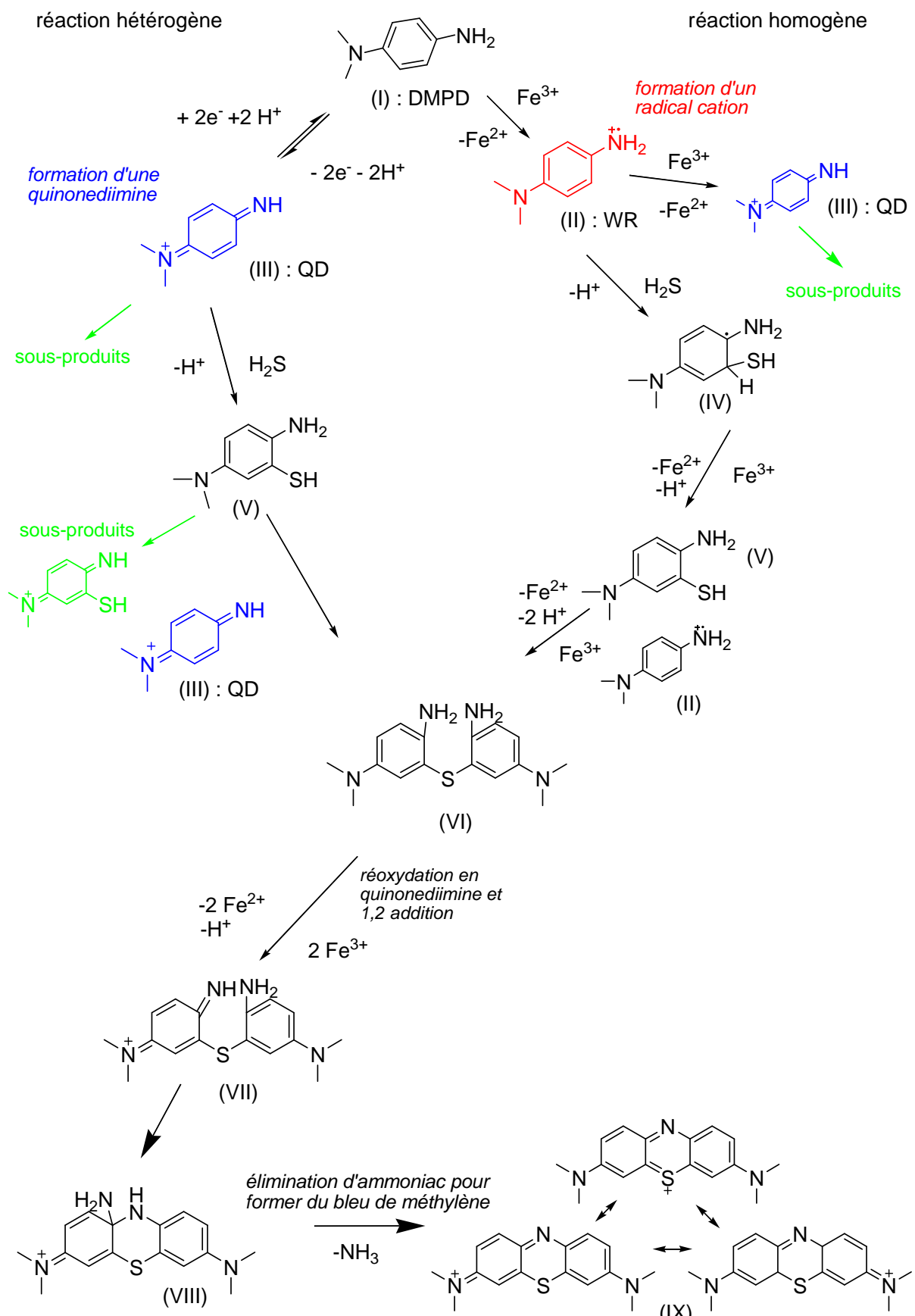


Figure 30 : Mécanismes réactionnels proposés par Kuban (voie de droite) et par Lawrence (voie de gauche) pour la formation de bleu de méthylène à partir de DMPD et de sulfure d'hydrogène.

IV.2. Mesures du rendement de formation de MB en fonction de l'acidité du milieu

Une des expériences préliminaires que nous avons réalisées est d'explorer l'effet de l'acidité sur le rendement de formation du bleu de méthylène. Les résultats obtenus ont permis de constater que le bleu de méthylène est d'autant mieux formé que le milieu réactionnel est acide (Tableau 6). Par ailleurs, une deuxième étude a été réalisée, en additionnant à des temps différents, une solution de H₂S à une solution de DMPD préalablement oxydée. Le rendement de formation de MB est déterminé à partir des valeurs d'absorbance de MB⁺ et MBH²⁺ à 668 et 750 nm et sa valeur est portée en fonction du temps d'attente avant l'introduction de H₂S. On peut ainsi observer qu'une solution de DMPD préalablement oxydée par FeCl₃, est 300 fois plus stable pour [HCl] = 2 M que pour [HCl] = 0,1 M (Figure 31). Ces résultats semblent à première vue en contradiction avec le fait que la quinonediimine soit l'intermédiaire réactionnel (postulat de Lawrence [180]) car cette dernière serait instable en milieu acide et aurait tendance à s'hydrolyser. [181] Cependant, il n'existe pas d'étude des précurseurs de MB à des acidités aussi élevées.

Stœchiométrie de la réaction : DMPD/FeCl ₃ /Na ₂ S 90/60/1	2M HCl	pH=1	pH=4,65
	20,3%	8,8%	Pas de MB formé

Tableau 6 : Rendements obtenus pour la formation de bleu de méthylène pour différentes concentrations en HCl. [DMPD] = 0,2 mM, [FeCl₃] = 0,12 mM et [Na₂S] = 0,002 mM.

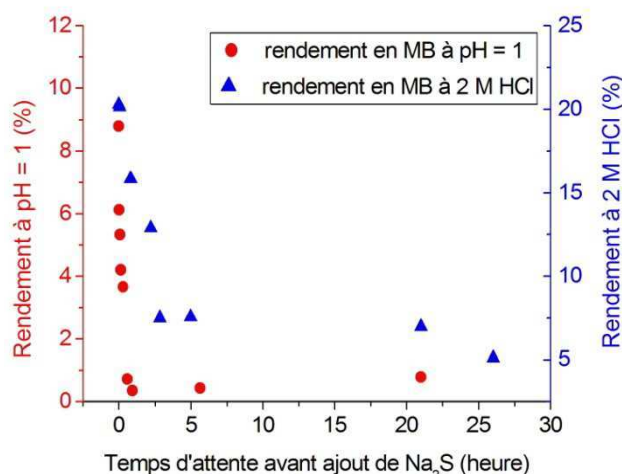


Figure 31 : Variation du rendement de MB en fonction du temps d'attente avant l'ajout de Na₂S. pH=1 et 2M HCl. ([DMPD] = 0,2 mM, [FeCl₃] = 0,12 mM et [Na₂S] = 0,002 mM)

Ces constatations montrent qu'il est nécessaire d'investiguer sur l'oxydation de la DMPD, surtout pour des concentrations élevées d'HCl. Dans un premier temps, il faut identifier les espèces présentes en solution sur la gamme de concentration d'acide qui nous intéresse, à savoir de 2M HCl à pH=4, mais qui n'a pas été totalement explorée, en particulier pour les fortes acidités. Dans cet objectif, en complément de l'étude de l'oxydation de la DMPD par Fe³⁺, nous utiliserons la spectroélectrochimie pour mettre en

évidence les espèces oxydées et déterminer leurs propriétés spectrales. Nous tacherons, entre autres, de connaître les domaines d'existence de la quinonediimine (QD) et du Wurster's red (WR). Le Wurster's red étant un radical cation paramagnétique, nous utiliserons la RPE (Résonance paramagnétique électronique) pour révéler sa présence. Avant de réaliser ces études, nous rappelons dans un premier temps les données connues de la littérature sur les différentes espèces entrant en jeu dans la formation du bleu de méthylène.

IV.3. Propriétés de la DMPD oxydée et de ses dérivés : Etat de l'art

D'après Kuban, la première étape du mécanisme de formation du MB consiste en l'oxydation à un électron de la DMPD par FeCl₃ en un radical cation : le Wurster's red.

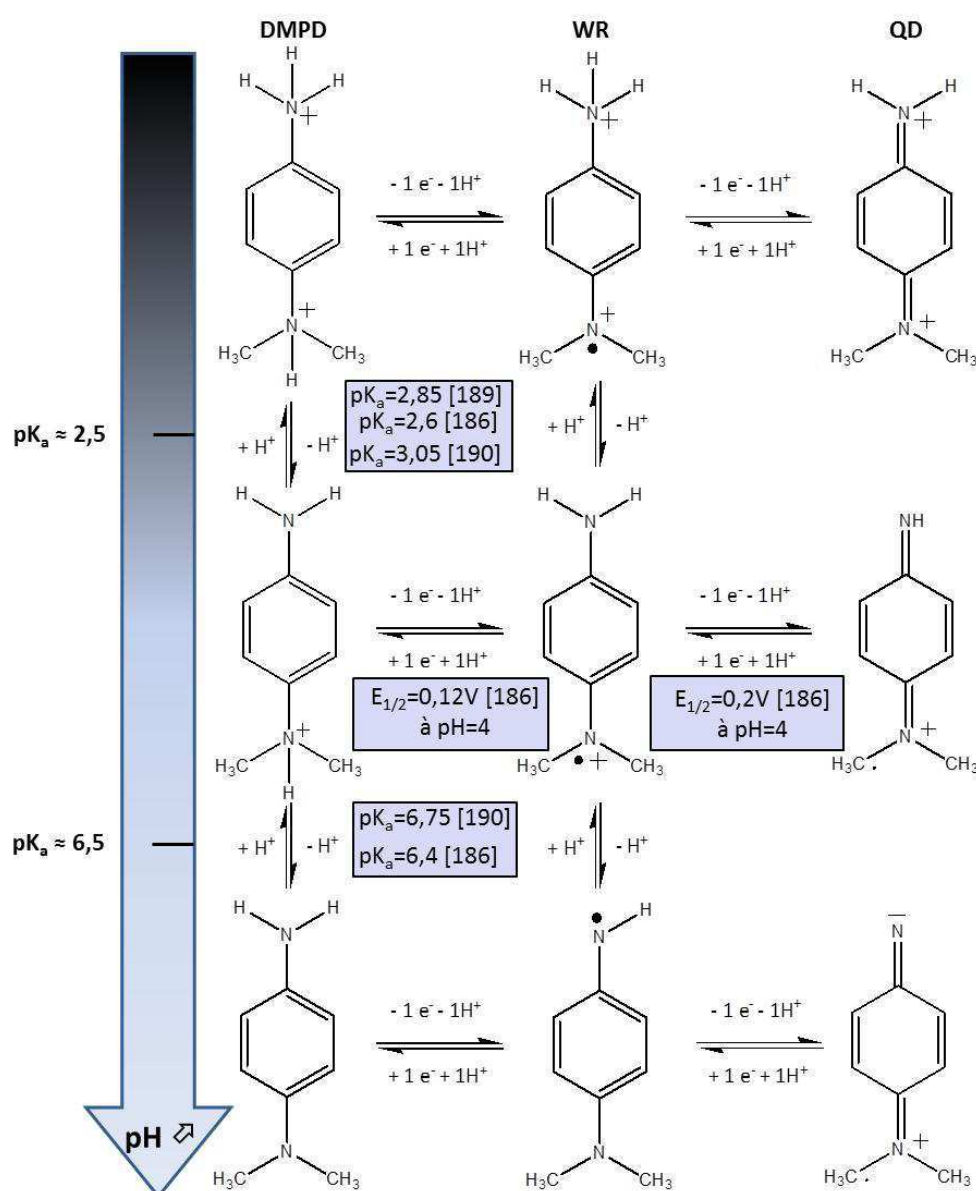


Figure 32 : Oxydation de la DMPD en WR et QD. [182] Les pKa de la DMPD et les potentiels de demi vague (E_{1/2}) recensés dans la littérature sont indiqués. [183,180,184]

Ce dernier peut subir une oxydation supplémentaire à un électron pour donner la quinonediimine (QD) (Figure 32). La DMPD est une diamine. Elle peut donc se protoner deux fois. Étant une espèce électroactive, la DMPD et ses formes protonées peuvent subir deux oxydations consécutives (Figure 32). On trouve dans la littérature des études sur le Wurster's red et la quinonediimine ainsi que les sous-produits issus de leur oxydation. Ces études sont résumées dans la section suivante.

IV.3.1. Le Wurster's Red

Une solution de DMPD.2HCl est jaune pâle. Lors de son oxydation à 1 électron en radical cation WR, elle devient rose vif (Figure 33). Le spectre UV-Visible du WR présente une double bande caractéristique à 515nm-550nm ($\epsilon_{515\text{nm}} = 7\,300 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ [185]; $\epsilon_{550\text{nm}} = 13450 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ à pH = 4,55 [165]). Parfois, un pic autour de 350 nm est également mentionné. [185] Le Wurster's Red est stable dans un domaine de pH compris entre 2,5 et 5,5. [165] Pour un pH de 4,55, le cation reste stable pendant plus de 7 jours en absence de O_2 . [190] Ce radical cation est en équilibre avec une autre substance incolore et beaucoup moins stable : la quinonediimine (QD) (Figure 33). [186]

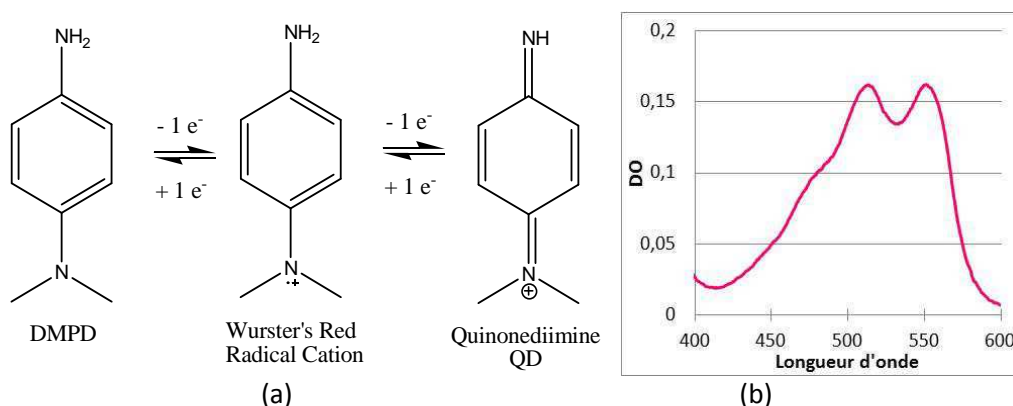


Figure 33 : (a) Oxydation de la DMPD à 1 ou 2 électrons menant respectivement au WR et à la QD ; (b) spectre d'absorption UV-visible du WR avec ses bandes caractéristiques à 515 nm et 550 nm.

Il est également rapporté que le Wurster's red forme des dimères. [187] Cependant, il ne peut pas polymériser sur lui-même à cause de sa fonction amine tertiaire ($-\text{N}(\text{Me})_2$). [187] Le dimère est formé en solution concentrée, à basse température (-10°C) ou à l'état cristallin, et est de couleur différente du radical cation (violet-marron au lieu de rose-rouge) d'après Michaelis. [190]

A pH acide compris entre pH = 4 et pH = 6, WR est très stable car plusieurs formes de résonance existent. A pH > 8, WR est instable et se dismute en formant QD et DMPD. [188] Cette réaction est instantanée et totale (Figure 34), mais est réversible si on abaisse le pH de la solution.

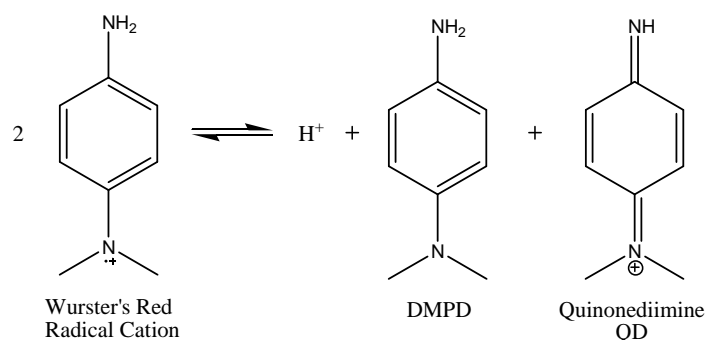


Figure 34 : Dismutation du WR en DMPD et QD à pH>8.

Une étude potentiométrique [189] montre que pour un pH compris entre 3,75 et 6,50, l'oxydation à l'anode de la DMPD se traduit par deux vagues successives (voir plus loin, Figure 45). Chaque vague compte pour un électron et ce phénomène est dû à la stabilité du WR dans cette zone de pH. En revanche, dans les domaines de pH inférieurs à 3,75 et supérieurs à 6,50 une seule vague est observée et elle compte pour deux électrons. [184]

IV.3.2. La Quinone diimine

La QD peut être formée via 2 mécanismes :

- ✓ Par dismutation de deux molécules de WR en une molécule de DMPD et une molécule de QD (Figure 34). [165,190,191]
- ✓ Par oxydation à 2 électrons de la DMPD en QD ou à 1 électron de WR en QD.

D'après la littérature, QD est très instable et incolore. En effet, en milieu acide et basique, la quinonediimine peut rapidement, et irréversiblement, s'hydrolyser en quinonemonoimine [181] notée Qm (Figure 35).

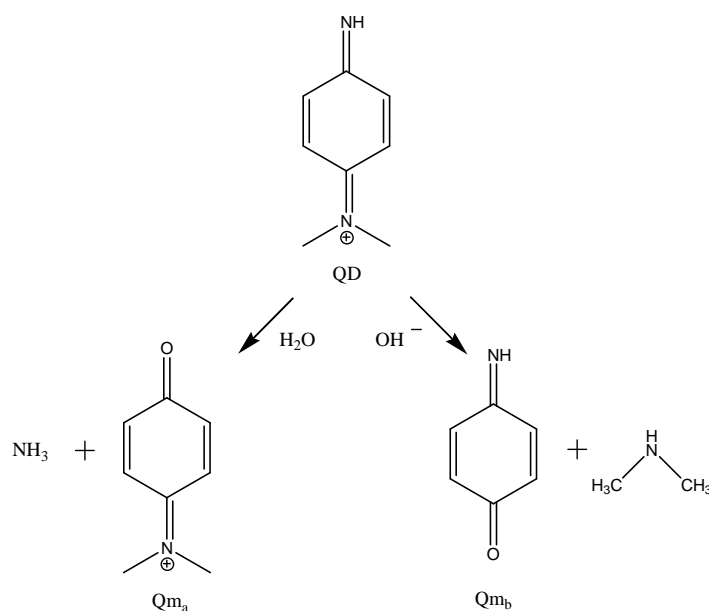


Figure 35 : Hydrolyse de la quinonediimine en quinonemonoimines ; en condition acide (1,4 < pH < 5), N,N-diméthyl-quinonemonoimine (Qm_a) est majoritairement obtenue [181,192] et en condition basique (8 < pH < 12), la quinonemonoimine Qm_b est obtenue [193].

Entre pH 8 et 12, la QD est hydrolysée en quinonemonoimine Qm_b . C'est la fonction amine tertiaire qui est hydrolysée pour donner de la diméthylamine. A pH acide, c'est l'amine primaire qui est majoritairement éliminée pour former la Qm_a . Plus le milieu est acide, plus l'hydrolyse se trouve catalysée et donc accélérée. A pH = 7, la réaction d'hydrolyse de QD est ralentie et le milieu réactionnel contient plus de QD que de Qm . Les quinonediimines absorbent généralement dans l'UV [193] ($\lambda = 290$ nm [194] et $\lambda = 285$ nm avec $\epsilon_{285nm} = 23\ 000$ L.mol⁻¹.cm⁻¹ [195]).

Pour savoir si la QD est présente dans un milieu, une réaction avec l' α -naphthol peut être envisagée car elle permet une détection colorimétrique. [163] Il est aussi possible de réaliser une analyse en spectrométrie de masse pour détecter la masse de la QD et celles de ses produits d'hydrolyse. [181,188]

IV.3.3. Sous produits d'oxydation

La dégradation de la quinonediimine ne consiste pas seulement en son hydrolyse irréversible en quinonemonoimines. Modestov *et al.* [181] ont étudié les mécanismes d'oxydation de la DMPD à différents pH en couplant une méthode électrochimique à une analyse en spectrométrie de masse. Ils proposent plusieurs réactions menant à environ une dizaine de sous-produits formés essentiellement vers pH = 7 (Figure 36) ou pH = 1,4 (Figure 37).

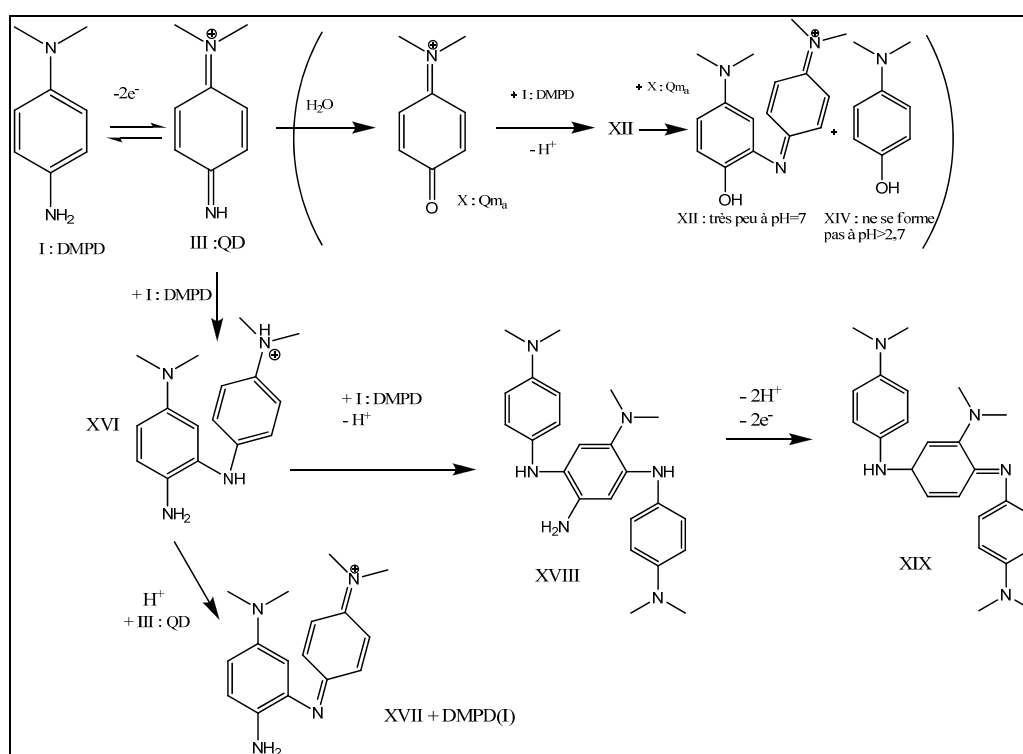


Figure 36 : Ensemble des réactions d'oxydation et de couplage pouvant avoir lieu à pH=7. [181]

A pH = 7 (Figure 37), la quinonediimine (III) peut réagir avec une molécule de DMPD

(I) non oxydée pour former le dimère intermédiaire (XVI). Ce dernier peut réagir soit avec une molécule de quinonediimine pour former le dimère conjugué (XVII), soit avec une molécule de DMPD pour former une base de Bandrowski (XIX), après oxydation de l'intermédiaire XVIII.

A pH = 5, toutes les réactions décrites dans les Figure 36 et Figure 37 ont lieu et les produits de réaction sont tous observés en spectrométrie de masse (sauf XII et XVI qui sont des intermédiaires réactionnels).

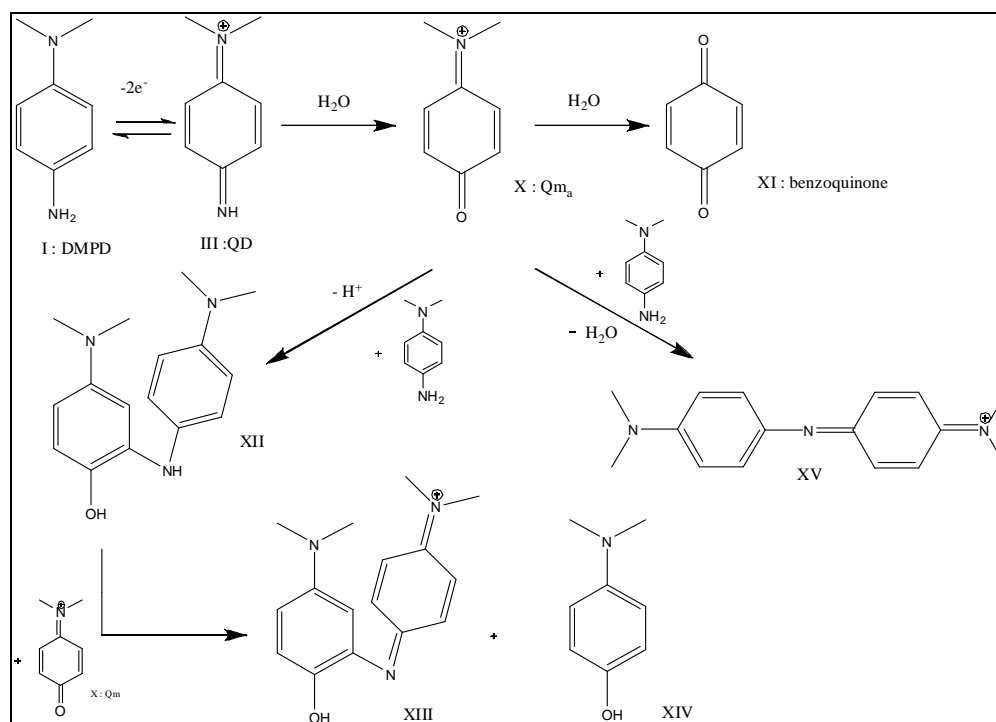


Figure 37 : Ensemble des réactions d'oxydation et de couplage pouvant avoir lieu à pH=1,4. [181]

A pH = 3,6, la détection en spectrométrie de masse des dimères conjugués XVI et XIII ainsi que de la base de Bandrowski (XIX) implique la présence de QD (III), Qm (X) et DMPD (I).

Le nombre d'espèces présentes est moins grand quand le pH diminue. A pH = 1,4, La DMPD est oxydée en QD (III) qui est très rapidement hydrolysée en Qm (X). L'hydrolyse de QD en Qm est d'ailleurs responsable de 80% de la perte de produits. Toutes les réactions impliquant QD (III) ne se produisent donc plus. Sont observés, le WR (II) ou la quinonemonoimine (X), la DMPD (I), le N,N-diméthyl-para-aminophénol (XIV) et les dimères conjugués XV et XIII. Cependant, les réactions entre sous-produits d'oxydation sont 5 fois moins rapides à pH = 1,4 qu'à pH=3,6. Le N,N-diméthyl-para-aminophénol (XIV, DMAP) apparaît avec l'oxydation de la DMPD et est observé à pH = 1,4 mais pas à pH = 2,5. En effet, XIV est issue de Qm (X) ; or l'hydrolyse est ralentie quand le pH augmente. D'après la littérature, les para-aminophénols peuvent s'oxyder, de façon réversible, en quinonemonoimines ($E_{1/2}$ vs SCE = 0,42 V [196]). Les para-aminophénols absorbent en solution aqueuse autour de 270 nm et les quinonemonoimines vers 320 nm et 460 nm. [197,198]

L'ensemble des études de la littérature a été mené entre pH=1,4 et pH=12 (Figure 38). Il existe donc une lacune concernant l'étude de l'oxydation de la DMPD pour des pH inférieurs à 1.

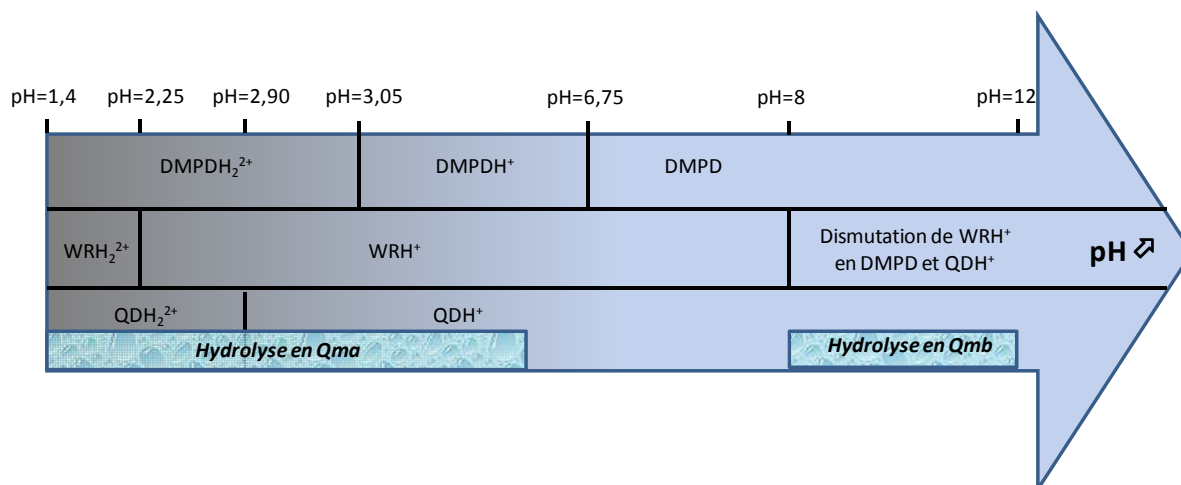


Figure 38 : Schéma récapitulatif des domaines d'existence des produits d'oxydation de la DMPD.

IV.4. Etude expérimentale des formes oxydées de DMPD

L'oxydation de la DMPD a été étudiée aux acidités qui nous intéressent, c'est-à-dire à 2M HCl et 10⁻¹ M HCl. Afin de pouvoir comparer les oxydations homogène et hétérogène, deux expériences sont réalisées. L'une consiste à oxyder une solution de DMPD avec FeCl₃ et l'autre avec une électrode de platine. Les solutions sont suivies dans le temps en spectrophotométrie d'absorption.


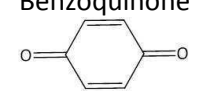
Composés	pH=1		2M HCl	
	Avant oxydation par FeCl ₃	Après oxydation par FeCl ₃	Avant oxydation par FeCl ₃	Après oxydation par FeCl ₃
AP (~DMAP) Aminophénol 	220nm, 272nm	220nm, 245nm, 287nm	220nm, 272nm	220nm, 338nm
BQ Benzoquinone 	220nm, 295nm	220nm, 330nm	220nm	220nm, 336nm
FeCl₃	224 nm, 330 nm $\epsilon_{(224nm)} = 442 \pm 9 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ $\epsilon_{(330nm)} = 80 \pm 2 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$		221 nm, 340 nm $\epsilon_{(221nm)} = 6600 \pm 140 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ $\epsilon_{(340nm)} = 2360 \pm 2360 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$	
FeCl₂	243nm, 332 nm $\epsilon_{(243nm)} = 24 \pm 0,5 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ $\epsilon_{(332nm)} = 1,9 \pm 0,04 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$		248nm, 339nm $\epsilon_{(248nm)} = 24 \pm 0,5 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ $\epsilon_{(339nm)} = 2,6 \pm 0,05 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$	

Tableau 7 : Tableau récapitulatif des maxima d'absorption observés pour les principaux sous-produits présents en solution lors de l'oxydation de la DMPD.

Une étude préliminaire est réalisée pour connaître les spectres d'absorption, et surtout les longueurs d'onde caractéristiques des maxima d'absorption, de deux sous-produits pouvant être formés pendant l'oxydation de la DMPD ainsi que des ions ferreux et ferriques. Pour ce faire, les formes commerciales des molécules suivantes sont utilisées :

- l'aminophénol (AP, Fluka) est disponible au laboratoire et a une structure proche du diméthyl-para-aminophénol (DMPD, composé XIV)
- la benzoquinone (BQ, Fluka, composé XI)
- les ions ferreux (FeCl_2 , Sigma Aldrich)
- les ions ferriques (FeCl_3 , Sigma Aldrich)

Les spectres d'absorption de AP et de BQ sont acquis avant et après ajout d'ions ferriques (Tableau 7 ; spectres en Annexe 5).

Connaissant les pics d'absorption caractéristiques des sous-produits d'oxydation de la DMPD, il est maintenant possible d'attribuer les espèces qui seront observés au cours des études en oxydation homogène et hétérogène.

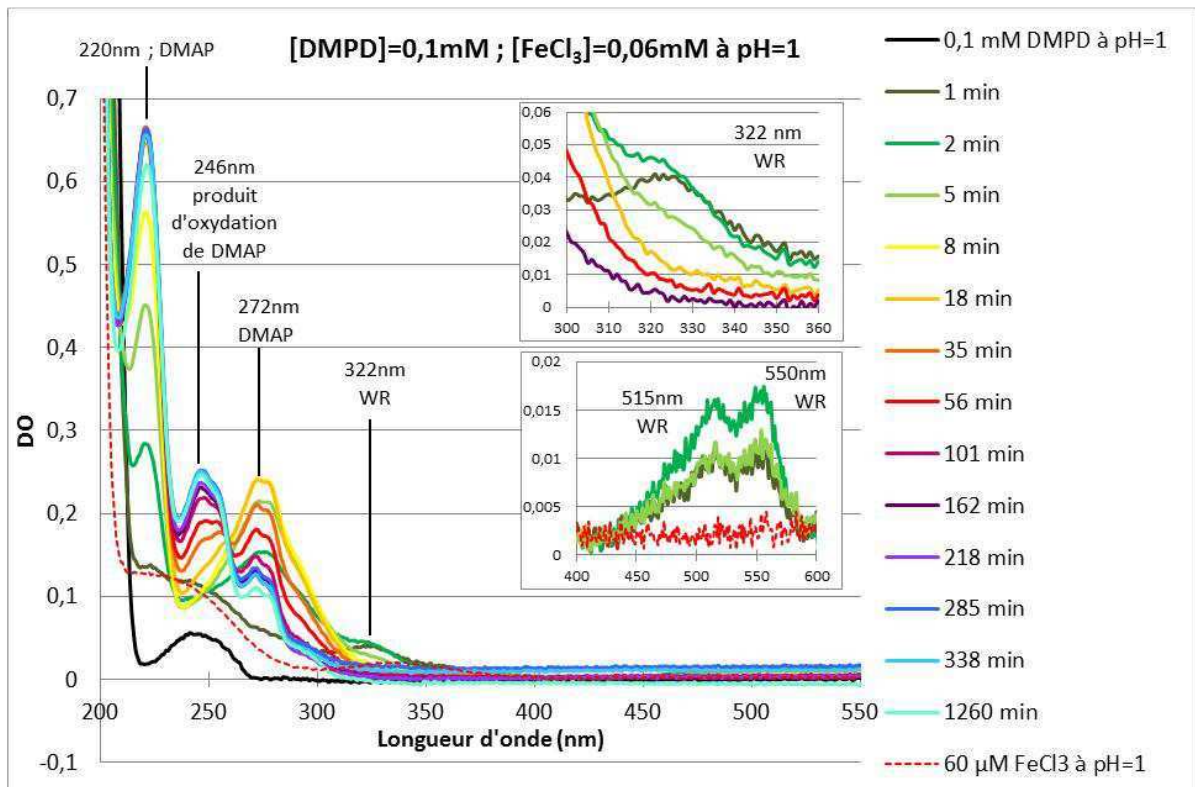
IV.4.1. Oxydation homogène avec FeCl_3

L'oxydation en phase homogène de la DMPD a lieu en présence de FeCl_3 . A $t=0$, 10 mL de DMPD 0,2 mM et 10 mL de FeCl_3 0,12 mM sont mélangés. Afin de suivre l'évolution spectrale du milieu réactionnel, un volume de 250 μL en est régulièrement prélevé pour acquérir le spectre d'absorption. La présence d'intermédiaire réactionnel est mise en évidence, via la formation ou non de bleu de méthylène, par l'ajout de 250 μL de Na_2S 0,1 mM à chaque prélèvement de 4 mL. Cette expérience est menée à 0,1 M HCl et à 2 M HCl.

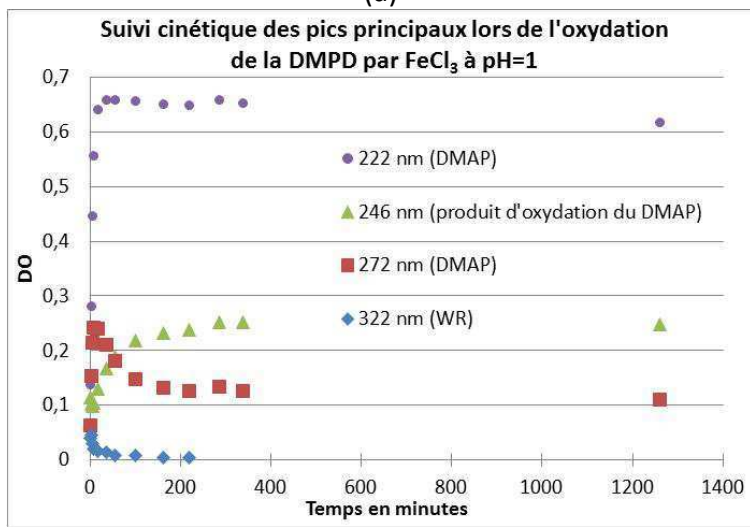
L'évolution spectrale d'une solution contenant DMPD 0,2 mM, Fe^{3+} 0,12 mM et HCl 0,1 M, est montrée dans la Figure 39(a).

De 1 à 5 minutes, on observe l'apparition et la croissance des bandes d'absorption typiques du WR à 515 et 550 nm de même qu'une nouvelle bande située autour de 320 nm, antérieurement attribuée au WR (Figure 39). [185] Le WR est formé puis disparaît totalement au bout de 8 min.

De 1 à 18 minutes, on observe entre 200 et 300 nm, des évolutions spectrales complexes qui témoignent de la présence simultanée de plusieurs espèces transitoires (Figure 39). L'interprétation ici donnée sera justifiée ultérieurement : la QD est formée instantanément et absorbe vers 280 nm ; elle évolue rapidement à $t = 2$ min vers l'espèce Qm_a (X) absorbant autour de 277 nm. [181] Cette dernière évolue vers une autre espèce, le DMAP (XIV), qui présente un maximum d'absorption à 272 nm. A partir de 18 minutes, le DMAP est oxydé en un sous-produit de structure inconnue qui absorbe à 246 nm et qui reste stable au bout de 2 heures.



(a)



(b)

Figure 39 : Une solution de DMPD à pH=1 est oxydée par FeCl₃. (a) spectres d'absorption de cette solution acquis à différents temps ; (b) Evolution spectrale au cours du temps

Le pic d'absorption à 220 nm est présent et augmente continuellement en intensité à partir de 2 min, lors de l'évolution de QD vers Qm_a vers DMAP et vers le produit d'oxydation de DMAP. L'augmentation d'intensité à 220 nm est importante pour les espèces Qm_a et DMAP, ce qui sera confirmé ultérieurement avec l'étude de spectroélectrochimie. En revanche, QD et le produit d'oxydation du DMAP n'absorbent pratiquement pas à 220 nm.

Etude de la bande d'absorption du WR dans l'UV

En traçant le spectre différentiel entre le spectre acquis à 1 minute et la somme du spectre de la DMPD et du spectre de FeCl_3 , on obtient une bande d'absorption large avec 2 maxima situés ~ 280 et ~ 319 nm (Figure 40). Nous attribuons ces pics d'absorption respectivement à QD et au WR sur la base de leur cinétique de disparition (Figure 40).

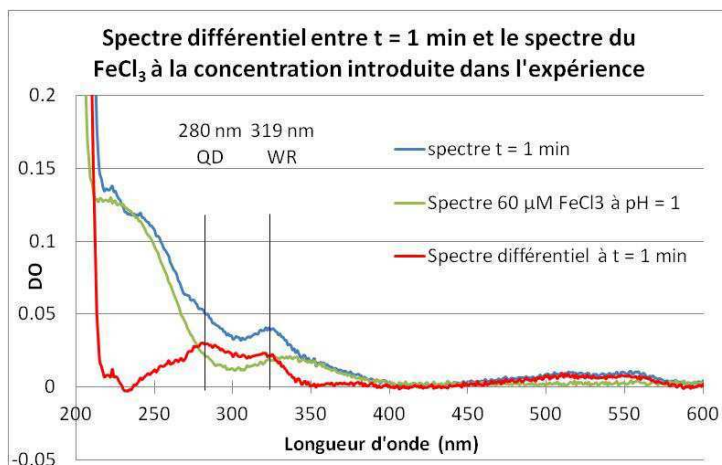


Figure 40 : Evolution spectrale du mélange DMPD et FeCl_3 et spectre différentiel à $t = 1$ minute

Etude des espèces transitoires absorbant entre 250 et 300 nm

L'établissement des spectres différentiels d'absorption à différents temps nous permettent d'observer clairement la formation initiale de QD ($t=1$ min) absorbant à ~ 285 nm (Figure 41). En même temps que sa concentration augmente, QD évolue vers Qm_a absorbant avec un maximum centré à 277 nm ($t=2$ min) (Figure 30). Une troisième espèce est formée en présence de QD et Qm_a à $t=5$ min comme en témoigne l'apparition d'un nouveau pic d'absorption à 272 nm, attribué à DMAP. Ces attributions seront confortées par les résultats de l'étude en électrochimie et spectroélectrochimie.

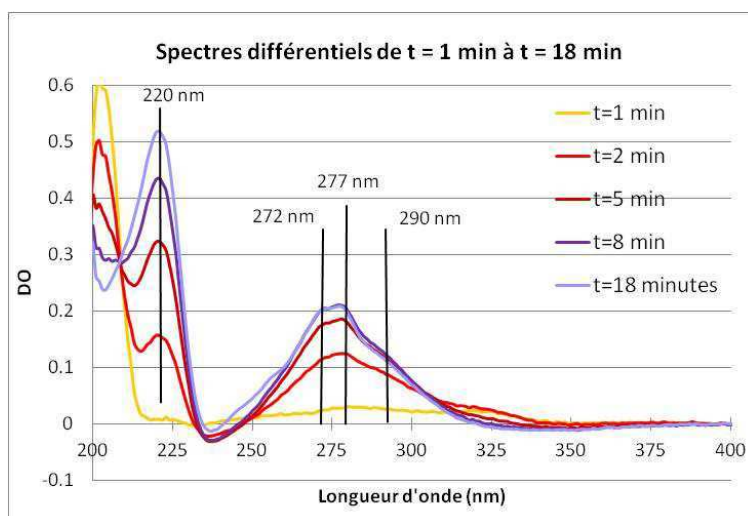


Figure 41 : Spectres différentiels du mélange DMPD + FeCl_3 à différents temps ($t-t_0$)

La Qma peut s'hydrolyser à nouveau en benzoquinone (BQ ; XI) mais ce composé absorbe très peu dans l'UV-visible et son pic à 295nm n'est pas observé. Les bandes d'absorption centrées à 220 et 272 nm continuent de croître au cours du temps. A t=18 minutes, celle centrée à 272 nm atteint son absorbance maximale et commence à disparaître lentement au profit d'une autre espèce absorbante d'intensité maximale à 246 nm. La présence de points isobestiques à 228 nm et 259 nm montrent que le DMAP absorbant à 220 nm et 272 nm évolue vers une seule espèce absorbant à 246 nm. Sur la base des évolutions spectrales, l'espèce absorbant à 220 et 246 nm est attribué à un produit de dégradation du DMAP (Figure 42 (b)).

La mise en évidence de la présence d'intermédiaire réactionnel est réalisée par ajout de Na_2S pour former du bleu de méthylène (Figure 42(a)). A pH = 1, l'intermédiaire réactionnel est présent pendant 18 minutes (Figure 42(b)). Les hypothèses du WR ou de la QD comme intermédiaires tiennent toujours car l'un comme l'autre sont formés dans cet intervalle de temps (on a vu les bandes du WR et de QD disparaître successivement et on observe des sous-produits issus de la QD). Ces deux expériences nous permettent de confirmer que le bleu de méthylène est formé à la fois via le WR et la QD.

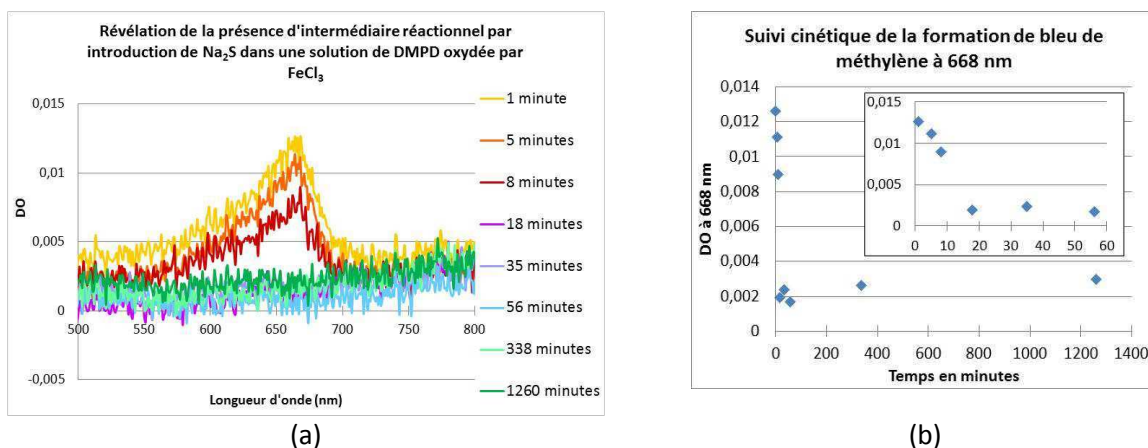
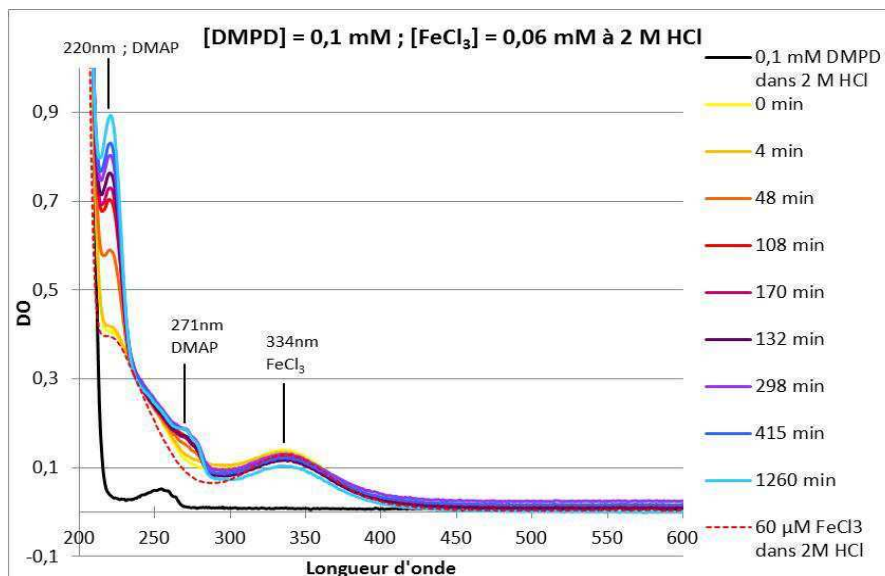
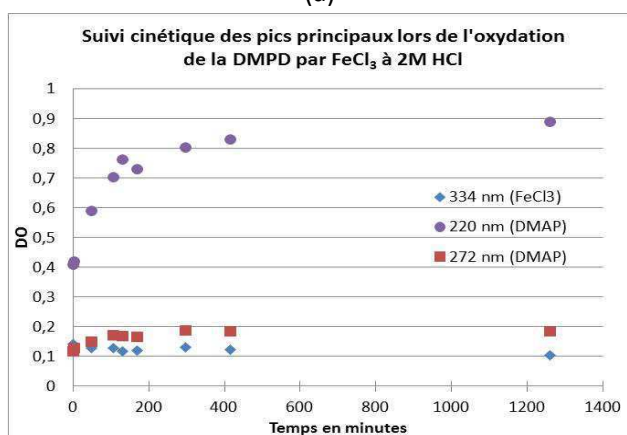


Figure 42 : Une solution de DMPD à pH=1 est oxydée par FeCl_3 . (a) révélation de la présence de l'intermédiaire réactionnel avec Na_2S – les 6 premiers spectres sont acquis à partir de solutions diluées au 1/2 - ; (b) Suivi cinétique de la formation du bleu de méthylène.

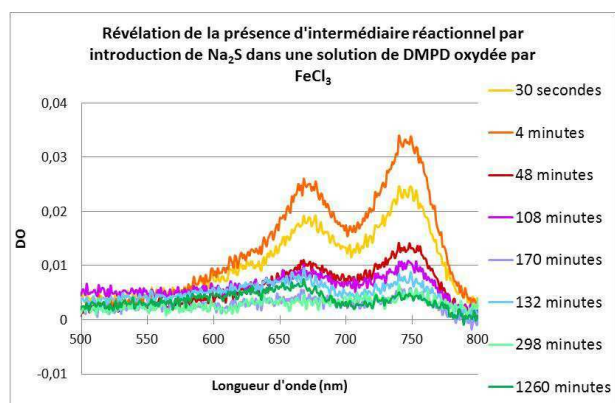
L'évolution spectrale d'une solution contenant DMPD 0,2 mM, Fe^{3+} 0,12 mM et HCl 2 M est montrée dans la Figure 43(a).



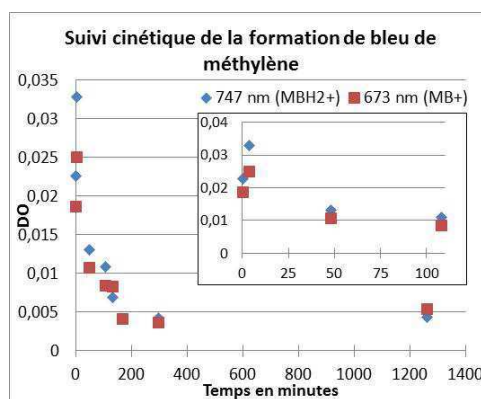
(a)



(b)



(c)



(d)

Figure 43 : Solution de DMPD à 2M HCl est oxydée par FeCl₃. (a) évolution spectrale au cours du temps temps ; (b) suivi cinétique des pics principaux ; (c) révélation de la présence de l'intermédiaire réactionnel avec Na₂S – les 4 premiers spectres et les 6^e et 7^e spectres correspondent à des solutions diluées au 1/2 - ; (d) Suivi cinétique de la formation du bleu de méthylène.

A t=4 min, on peut noter l'apparition de deux bandes d'absorption de faible intensité centrées à 220 et ~280 nm. La position de cette dernière est déterminée en traçant le

spectre différentiel afin de s'affranchir du pic de Fe^{3+} à 334 nm dont l'absorption est importante (Figure 44). Nous attribuons cette première espèce intermédiaire à QD.

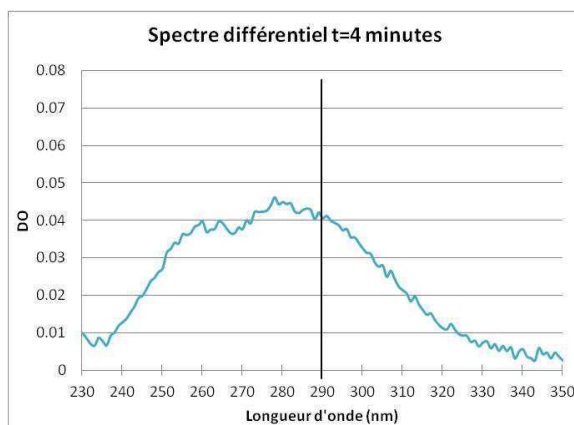


Figure 44 : Solution de DMPD à 2M HCl est oxydée par FeCl_3 : Spectre différentiel à t=4 minutes

La bande à ~ 280 nm diminue d'intensité au cours du temps pour évoluer vers l'espèce absorbant à 272 et 220 nm, attribuée à DMAP. Le point isobestique observé à 283 nm témoigne de l'évolution de QD vers DMAP qui atteint une absorbance maximale au bout de 1270 min. Etant donné la lenteur avec laquelle DMAP apparaît (Figure 43(b)), on peut dire que les phénomènes d'hydrolyse sont très ralentis à 2M HCl. Quant aux pics du WR, ils ne sont pas observés.

L'introduction de Na_2S montre que l'intermédiaire réactionnel est présent pendant 21 heures (1260 minutes), ce qui est compatible avec la lente évolution de QD vers DMAP. Pendant cet intervalle de temps, le bleu de méthylène peut être formé à partir de QD (Figure 43(c) et (d)). Le tracé de la courbe de formation de MB à différents stades de l'évolution des espèces intermédiaires montre que sa formation suit bien celle de l'apparition de DMAP ou encore de la disparition de QD qui lui est corrélée (Figure 43(d)).

Sur la base de ces résultats, nous attribuons l'espèce intermédiaire, précurseur principal dans la formation de MB, à QD.

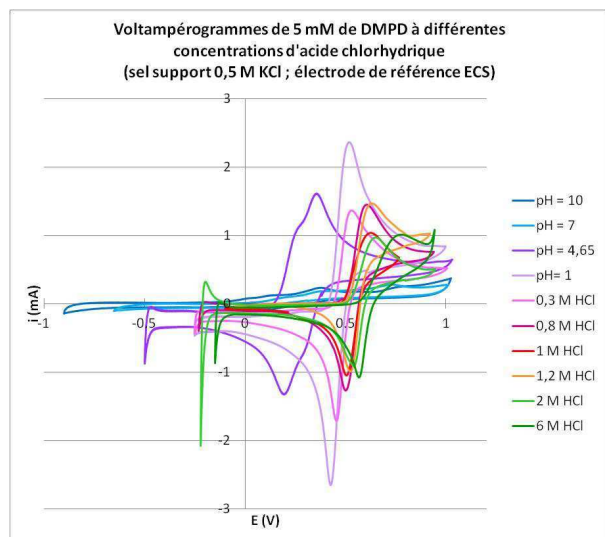
Le pic d'absorption des ions ferriques (FeCl_3) à 340 nm est gênant pour la détermination spectrale de l'intermédiaire réactionnel dans la formation de bleu de méthylène. L'oxydation hétérogène, à la surface d'une électrode, de la DMPD permet de s'affranchir du spectre d'absorption de FeCl_3 .

IV.4.2. Oxydation hétérogène en électrochimie

Dans un premier temps, l'étude de l'oxydation de la DMPD est réalisée en voltampérométrie cyclique afin de connaître le comportement de la DMPD en fonction de la concentration en acide chlorhydrique. Les potentiels redox de la DMPD peuvent ainsi être déterminés à partir des potentiels de pics. Dans un second temps, une étude en électrolyse est réalisée. Des électrolyses en oxydation puis en réduction sont réalisées et l'évolution du spectre d'absorption de la solution de DMPD est observée.

IV.4.2.a. Etude en voltampérométrie cyclique

En oxydation hétérogène, il a été montré que l'oxydation de la DMPD conduit directement à la quinonediimine. En effet, l'électrode échange un maximum d'électrons, c'est-à-dire 2 dans le cas de la DMPD. Le potentiel d'oxydoréduction ($E_{1/2}$) de la DMPD a été déterminé par voltampérométrie cyclique (Figure 45(a)) avec un PGSTAT 100 (Autolab). Il est calculé expérimentalement à partir des potentiels de pics (Figure 45(b)).



données voltacycliques

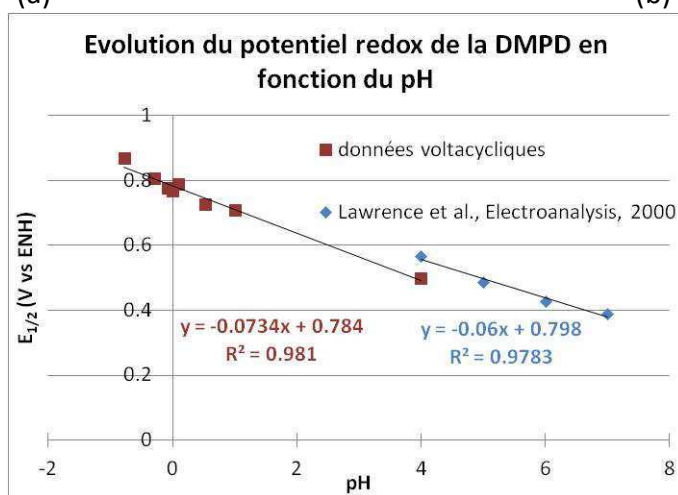
pH = -log([H ⁺])	[H ⁺]	p _a	p _c	E _{1/2} (vs ECS)	E _{1/2} (vs ENH)
-0,78	6,00	0,74	0,57	0,66	0,868
-0,30	2,00	0,63	0,55	0,59	0,808
-0,08	1,20	0,61	0,54	0,57	0,778
0,00	1,00	0,61	0,52	0,56	0,768
0,10	0,80	0,61	0,51	0,56	0,788
0,52	0,30	0,51	0,46	0,49	0,728
1,00	0,10	0,51	0,43	0,47	0,708
4,65	10 ⁻⁴	0,34	0,21	0,28	0,498

Lawrence *et al.*, Electroanalysis, 2000

pH	E (vs ECS)	E (vs ENH)
7	0,14	0,388
6	0,18	0,428
5	0,24	0,488
4	0,32	0,568

(a)

(b)



(c)

Figure 45 : Relation entre le pH et le potentiel redox de la DMPD. (a) Voltampérométrie cyclique obtenue pour la DMPD à différentes concentrations d'HCl ; (b) Détermination du potentiel redox de la DMPD à partir des voltampérométries de (a) ; (c) Comparaison de la relation potentiel – pH de la DMPD issue de la littérature [180] avec celle obtenue à partir des valeurs expérimentales de voltampérométrie cyclique.

L'évolution du potentiel d'oxydoréduction de la DMPD ($E_{1/2}$) a été étudiée en fonction du pH. On constate que plus le pH diminue, plus le potentiel redox augmente (Figure 45(c)).

En d'autres termes, l'oxydation de la DMPD est rendue plus difficile à mesure que la DMPD est protonée. La littérature confirme cette observation. [180] On peut alors s'interroger sur la possibilité d'oxyder la DMPD avec Fe^{3+} dans les milieux très acides ($[\text{HCl}] > 1 \text{ M}$). Lorsqu'on superpose les diagrammes potentiel-pH de la DMPD et du fer (Figure 46), on observe qu'à l'équilibre, les conditions de réaction (concentration élevée en acide) sont en défaveur de l'oxydation de la DMPD par les ions Fe^{3+} . L'oxydation de la DMPD par Fe^{3+} ne peut plus avoir lieu pour les $\text{pH} < 0$. Expérimentalement, il est possible d'oxyder la DMPD avec Fe^{3+} en condition acide jusqu'à $[\text{HCl}] = 6 \text{ M}$.

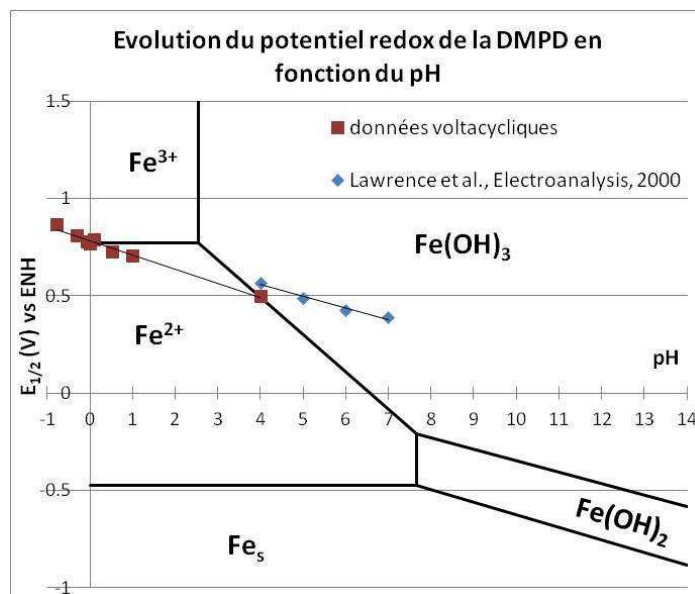


Figure 46 : Domaine d'oxydation de la DMPD par Fe^{3+} en fonction du pH. Superposition des diagrammes potentiel-pH de la DMPD et du fer. [199]

On note la présence d'un épaulement sur le voltampérogramme de la DMPD à $\text{pH} = 4,65$ (Figure 45(a)). Dans ce cas, les deux oxydations successives à un électron ont un potentiel très proche, ce qui explique la présence d'un épaulement un peu avant le pic d'oxydation. [180] Quel que soit la concentration en HCl comprise entre 6 M à 10^{-4} M, les voltampérogrammes cycliques obtenus au cours des différents cycles pour une solution donnée de DMPD sont superposables, ce qui signifie que des phénomènes réversibles ont lieu. En revanche, l'allure des voltampérogrammes obtenus à $\text{pH} = 7$ et $\text{pH} = 10$ (Figure 47) évoluent au cours des cycles. Dans ces cas, des phénomènes irréversibles ont lieu lors de l'oxydation de la DMPD, et sont probablement dûs à la formation de sous-produits suffisamment stables pour subir eux-mêmes une oxydation. L'apparition de nouvelles vagues d'oxydation vient appuyer ces hypothèses.

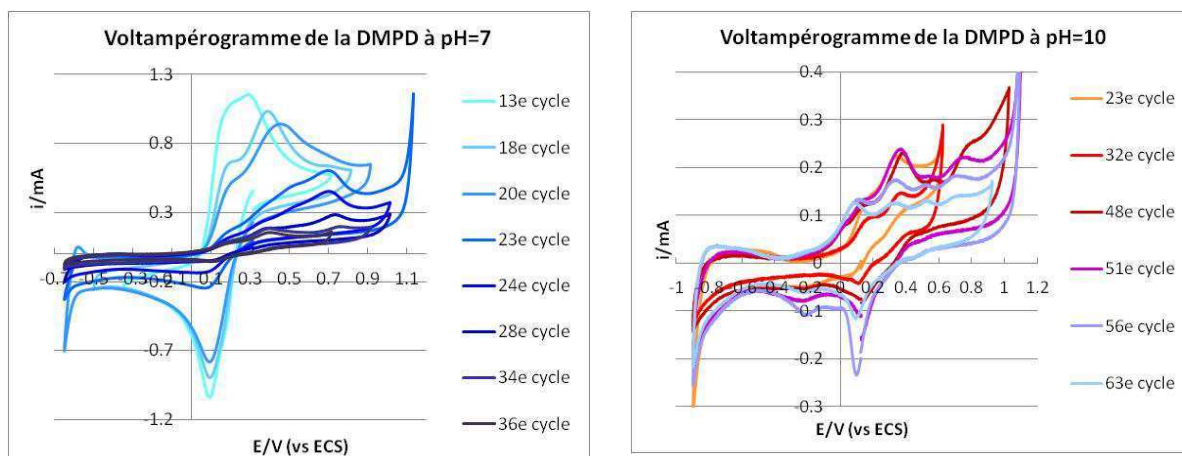


Figure 47 : Evolution des voltampérogrammes cycliques lors de l'étude de la DMPD à pH=7 et à pH=10. L'intensité du courant diminue au cours des cycles car la DMPD est consommée. La DMPD est instable à ces pH. De nouvelles vagues de potentiel apparaissent et correspondent aux oxydo-réductions des sous-produits formés.

IV.4.2.b. Etude en électrolyse

Afin de déterminer le spectre de QD, en l'absence de FeCl_3 qui absorbe fortement à 340 nm à 2 M HCl, l'oxydation électrochimique de la DMPD est envisagée. Pour cette étude, une cuve en quartz de chemin optique de 1 mm, équipée de micro électrodes est utilisée (Figure 48). L'électrode de Pt est une grille qui favorise l'adsorption des espèces oxydées sur une grande surface. La lumière d'analyse peut la traverser et est collectée à l'aide d'un spectrophotomètre. Les spectres d'absorption des espèces formées au cours de l'électrolyse sont enregistrés.

Des solutions de DMPD (0,5 mM) et de KCl (0,5 M) sont préparées à pH = 1,5 et 2 M HCl. Une électrolyse à potentiels imposés permet de réaliser successivement des oxydations et des réductions.

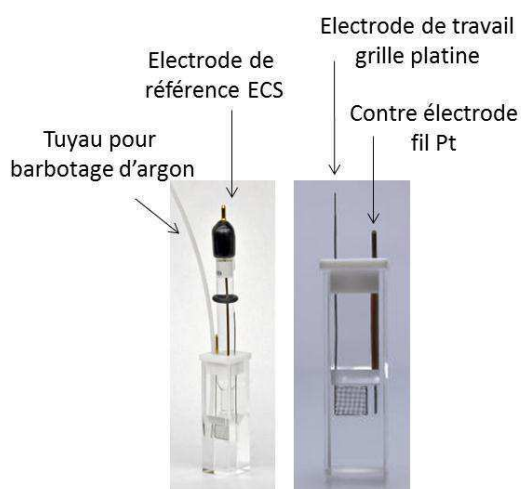


Figure 48 : photos du montage Bio-Logic pour l'étude de l'oxydation de la DMPD en spectroélectrochimie.

Les propriétés optiques des molécules pouvant être présentes en solution pendant l'électrolyse sont résumées dans le Tableau 8.

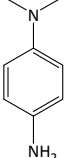
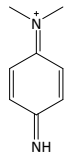
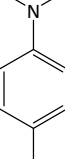
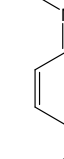
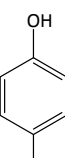
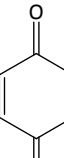
Espèce réduite		Espèce oxydée		
	<p>DMPD</p> <p>A pH = 1 : 240 nm</p> <p>A 2 M HCl : 255 nm</p>		<p>QD</p> <p>A pH = 1 : 220 et 280 nm</p> <p>A 2 M HCl : 220 et 280 nm</p>	
	<p>DMAP</p> <p>A pH = 1 : 220 nm et 272 nm</p> <p>A 2 M HCl : 220 nm et 272 nm</p>	<p>λ_{iso}</p> <p>226 nm</p>		<p>Qm_a</p> <p>A pH = 1 : inconnu</p> <p>A 2 M HCl : inconnu</p>
	<p>HQ</p> <p>A pH = 1 : 220 nm et 287 nm</p> <p>A 2 M HCl : 220 nm et 287 nm</p>		<p>BQ</p> <p>A pH = 1 : 220 nm et 295 nm</p> <p>A 2 M HCl : 220 nm</p>	

Tableau 8 : Molécules présentes pendant l'oxydation et la réduction de la DMPD.

A pH=1,5, un potentiel de + 0,7 V est imposé en oxydation et un potentiel de + 0,2 V est imposé en réduction. Ces potentiels sont choisis de façon à être supérieur au potentiel du pic anodique (pour l'oxydation) et inférieur au potentiel cathodique (pour la réduction).

Lors de l'oxydation, un pic d'absorption à 220,6 nm et un autre autour de 290 nm sont observés (Figure 49(a)). Ces deux pics augmentent simultanément et nous l'attribuons sur la base des résultats précédents à QD. On remarque cependant, que le sommet du deuxième pic se décale en fonction du temps de 290 nm à 277,3 nm. Cette observation laisse à penser que deux espèces absorbent autour de ces longueurs d'onde. Le pic à 220 nm est commun aux molécules présentant un cycle aromatique (QD, DMAP, BQ et HQ). Ici, l'apparition du pic 220,6 nm peut être interprétée comme l'oxydation de la DMPD en QD qui s'hydrolyse rapidement en Qm_a.

Nous avons donc la présence de deux espèces, la QD (220 et 290 nm) et la Qm_a (220 et 277 nm), cette dernière absorbant plus intensément à 220 nm que QD, ce qui corrobore les résultats de l'étude en phase homogène.

Lors de la réduction, le pic à 277,3 nm diminue et se décale vers 271nm (Figure 49(b) et (d)). On peut supposer que la QD formée lors de la précédente phase d'oxydation se réduit en DMPD (absente du spectre car son coefficient d'extinction molaire est très faible) et que la Qm_a formée est réduite en DMAP (pics caractéristiques à 220,6 nm et 271 nm). En effet, le pic à 220,6 nm continue d'augmenter pendant la phase de réduction car, comme nous l'avons vu précédemment, le DMAP absorbe intensément à 220 nm (Figure 49(c)). Il existe donc un équilibre d'oxydoréduction entre les espèces Qm_a et DMAP d'où la présence d'un point isobestique à 226 nm. Notons que les pics du WR ne sont pas observés.

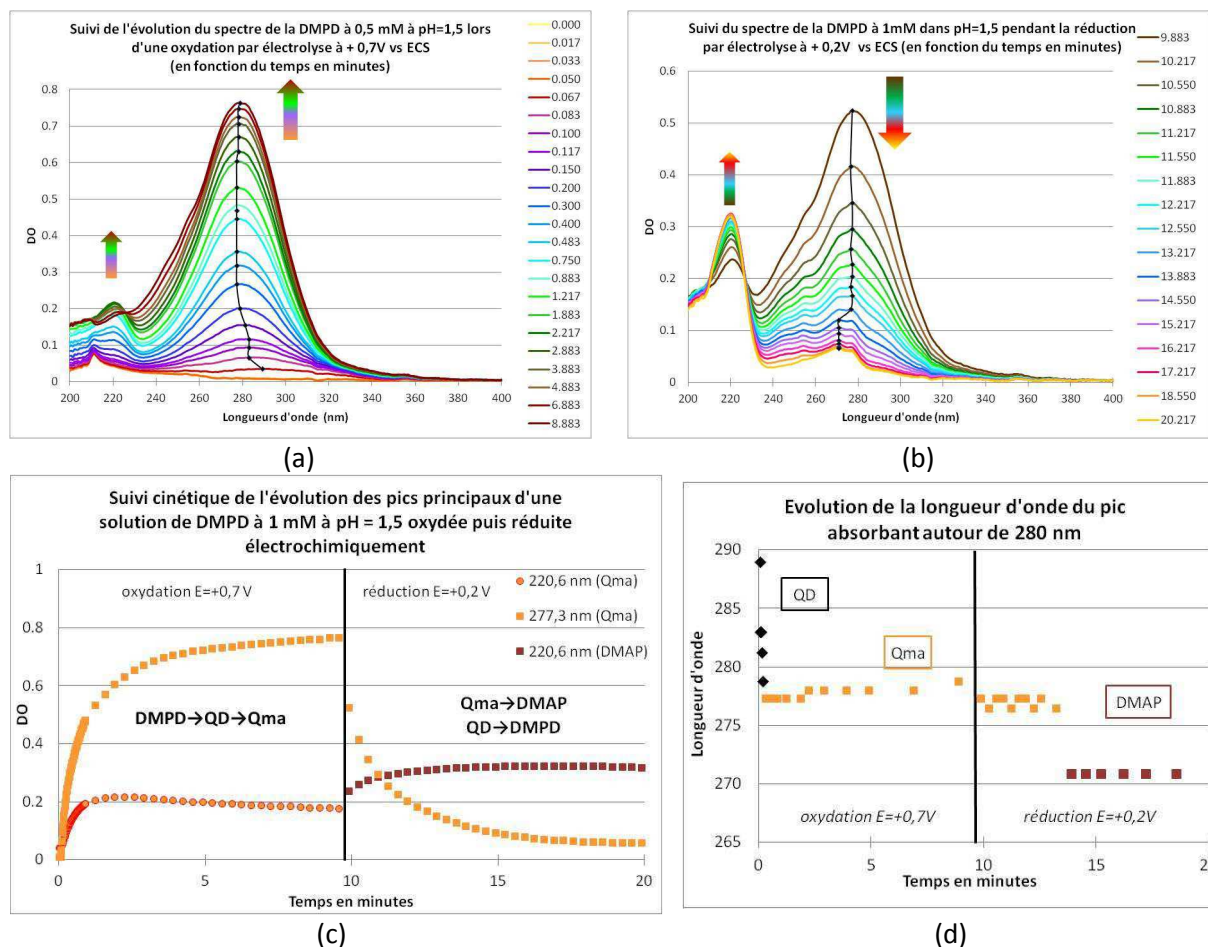
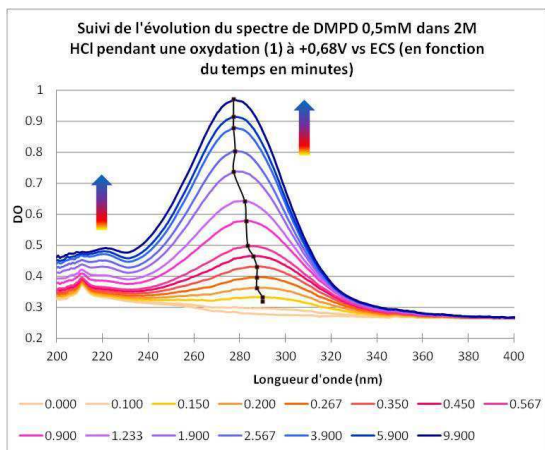
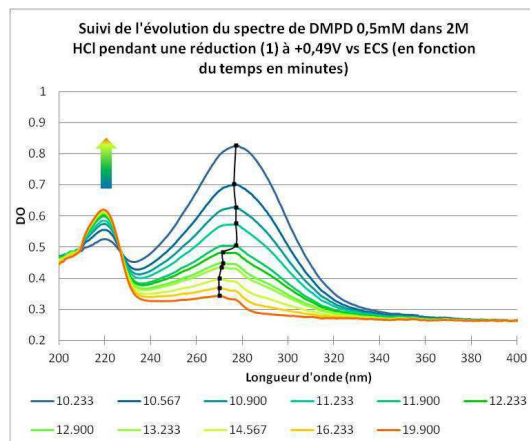


Figure 49 : Etude spectroélectrochimique de la DMPD à 1mM à pH=1,5. (a) Suivi du spectre d'absorption au cours d'une oxydation à +0,7V vs ECS ; (b) Suivi du spectre d'absorption au cours d'une réduction à +0,2V vs ECS ; (c) Suivi cinétique des pics principaux ; (d) Evolution de la longueur d'onde du maximum du second pic.

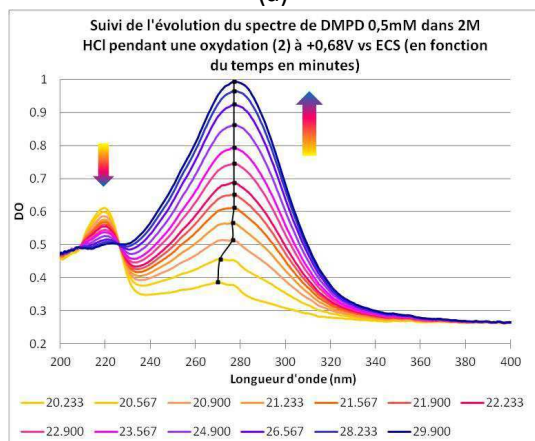
A 2 M HCl, deux cycles consécutifs d'oxydation et de réduction sont effectués. Lors du premier cycle d'oxydation et de réduction, les phénomènes observés à pH = 1,5 se produisent également à 2 M HCl. En effet, lors de la première oxydation (Figure 50(a)), on observe l'apparition et l'augmentation de 2 pics à 220 nm et 290 nm. A noter que la longueur d'onde du maximum du deuxième pic évolue de 290 nm à 277 nm au cours de l'oxydation. Il s'agit de la QD ($\lambda = 290$ nm), qui en même temps qu'elle se forme, est hydrolysée en Qm_a ($\lambda \approx 220$ nm et 277 nm). Lors de la première réduction (Figure 50(b)), le pic à 220 nm continue d'augmenter tandis que le pic à 277 nm diminue tout en se décalant vers 271 nm (Figure 50(e)). Ces pics correspondent au DMAP qui est formé suite à la réduction de la Qm_a.



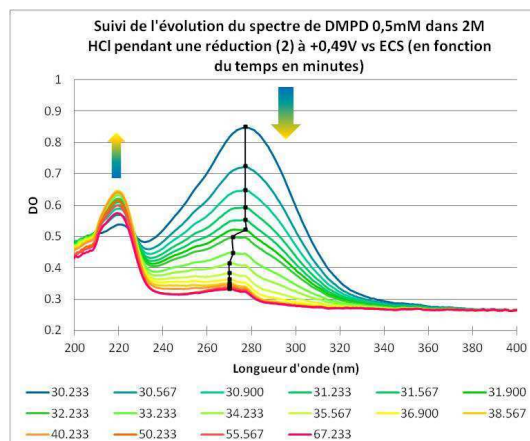
(a)



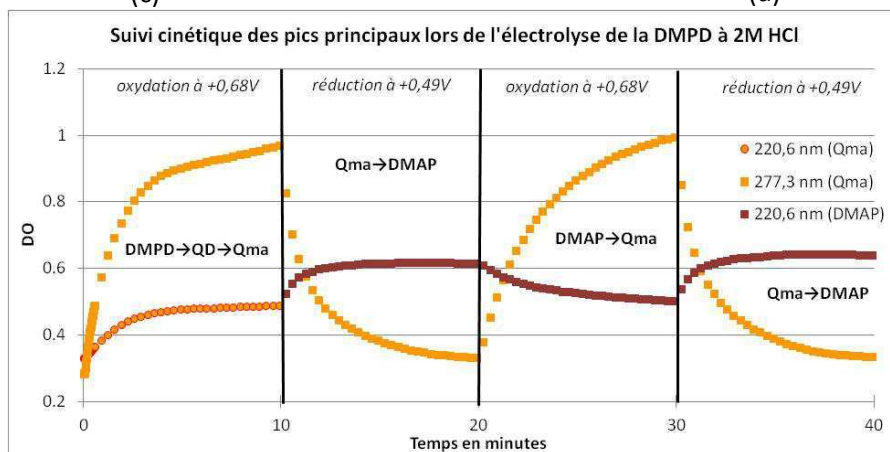
(b)



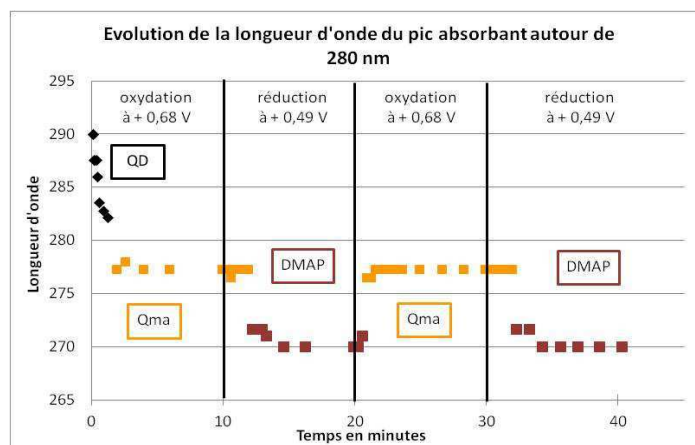
(c)



(d)



(e)



(f)

Figure 50 : Etude spectroélectrochimique de la DMPD à 0,5 mM à 2 M HCl. (a) Evolution spectrale lors de la 1^{ère} oxydation à + 0,68 V vs ECS ; Evolution spectrale (b) lors de la 1^{ère} réduction à + 0,49 V vs ECS ; (c) lors de la 2^{ème} oxydation à + 0,68 V vs ECS ; (d) lors de la 2^{ème} réduction à + 0,49 V vs ECS ; (e) Suivi cinétique des pics principaux ; (f) Evolution de la longueur d'onde du maximum du second pic.

Lors du deuxième cycle d'oxydation et de réduction, on assiste à l'oxydo réduction du couple Qm_a /DMAP. En effet, lors de la deuxième oxydation (Figure 50(c)), le DMAP est oxydé en Qm_a , ce qui entraîne la diminution du pic à 220 nm et l'augmentation du pic à 277 nm. Lors de la deuxième réduction (Figure 50(d)), la Qm_a est réduite en DMAP, ce qui explique l'augmentation du pic à 220 nm et la diminution du pic à 277 nm et son décalage vers 271 nm (Figure 50(f)). La réversibilité des phénomènes et la présence du point isobestique à $\lambda_{iso} = 226$ nm confirme qu'il s'agit d'un équilibre entre les deux membres d'un couple oxydant-réducteur.

En fin d'expérience, le spectre obtenu reste différent du spectre initial de la DMPD. Un phénomène irréversible a donc lieu : il s'agit de l'hydrolyse de la QD et de la production de DMAP. Les résultats obtenus en spectroélectrochimie viennent confirmer les attributions des espèces intermédiaires observés lors de l'oxydation chimique de la DMPD par Fe^{3+} . En particulier, nous pouvons confirmer que QD présente deux bandes d'absorption peu intenses centrées à 220 et 290 nm et que le produit de dégradation finale est le DMAP absorbant intensément à 220 nm et à 271 nm. La spectroélectrochimie nous a permis de mettre en évidence l'espèce intermédiaire Qm_a qui présente des bandes d'absorption à 220 et 277 nm.

IV.4.3. Etude en résonance paramagnétique électronique (RPE)

Pour confirmer la nature de l'intermédiaire réactionnel (WR ou QD) permettant de former du bleu de méthylène, nous avons également entrepris une étude en résonance paramagnétique électronique (RPE). Un spectromètre EMXplus X-band (Bruker Biospin GmbH) équipé d'un résonnateur haute sensibilité (4119HS-W1, Bruker) est utilisé. WR est un radical cation paramagnétique et pourra être détecté. En revanche, la QD est une espèce diamagnétique et ne donnera aucun signal. Dans un premier temps, le spectre du Wurster's

red est acquis à pH = 4,65, domaine où il est relativement stable. La comparaison avec le spectre simulé et la concordance des constantes de couplage obtenues avec celles de la littérature [200] permettent de confirmer que l'on forme bien du WR à pH = 4,65 (Figure 51).

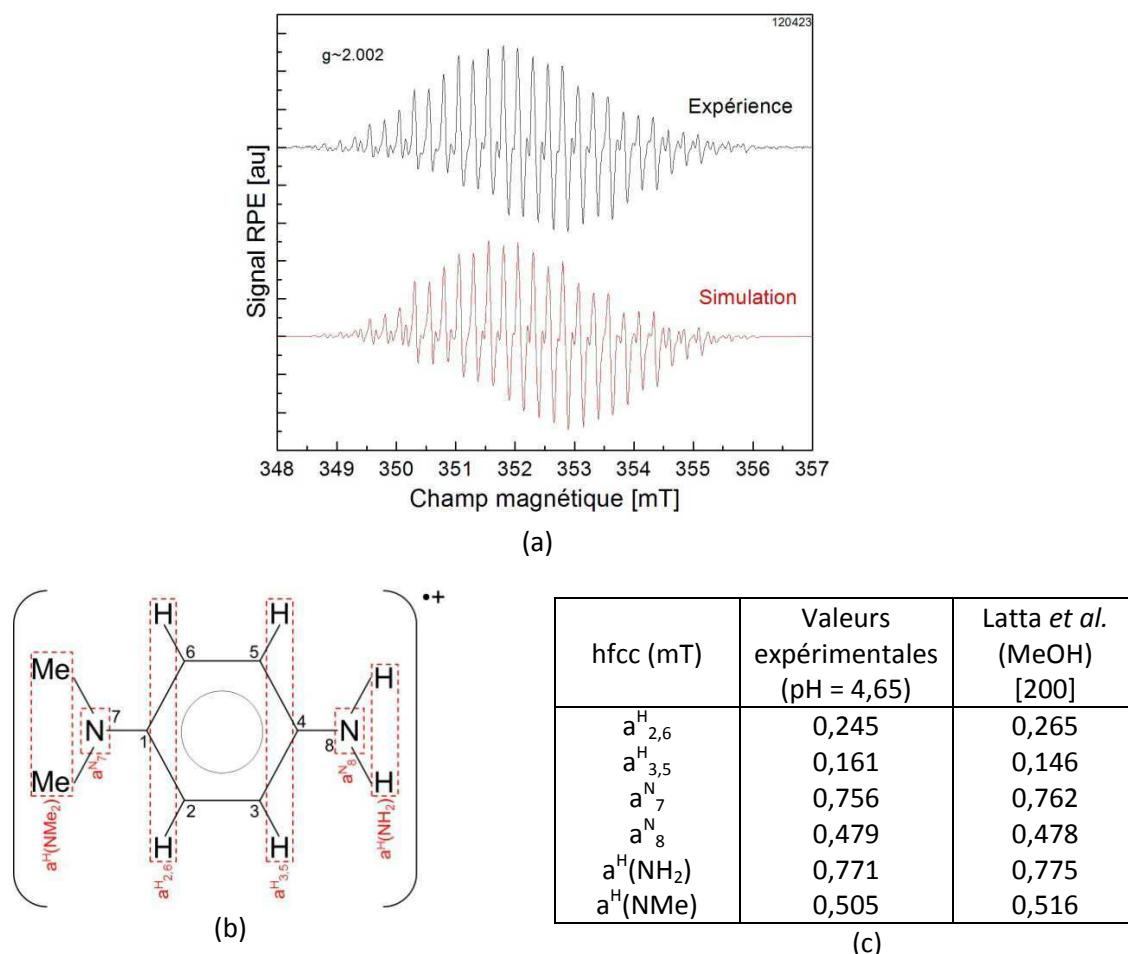


Figure 51 : Etude RPE du WR en tampon acétate à pH=4,65. (a) Comparaison entre le spectre expérimental (en noir) et simulé (en rouge) ; (b) Rappel de la structure du radical cation Wurster's Red et description des couplages ; (c) Tableau comparatif entre les constantes obtenues par Latta *et al.* dans le méthanol et celles obtenues dans le cadre de la thèse.

Le spectre RPE d'une solution de DMPD oxydée par FeCl_3 à 2 M HCl est acquis (Figure 52). Na_2S est ensuite ajouté à cette solution comme révélateur de la présence de l'intermédiaire réactionnel via la formation de bleu de méthylène. Le spectre RPE du Wurster's red n'est pas détecté à 2M HCl. La formation de bleu de méthylène lors de l'introduction d'une solution de Na_2S montre que l'intermédiaire réactionnel est présent à 2M HCl et que ce n'est pas le Wurster's red.

Ces résultats viennent de nouveau confirmer que dans les milieux très acides, la quinonediimine est l'intermédiaire réactionnel lors de la formation de bleu de méthylène. Ce résultat contredit les données de la littérature qui montrent que les phénomènes d'hydrolyse de la quinonediimine sont accélérés par catalyse acide. En effet, nous avons montré qu'à très forte acidité, l'oxydation de la DMPD par Fe^{3+} est ralentie et que la durée de vie de QD augmente considérablement.

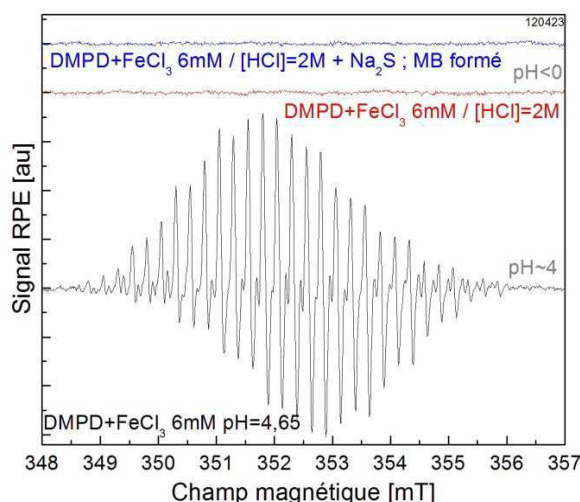


Figure 52 : Spectres RPE d'une solution de DMPD oxydée par FeCl_3 à 2 M HCl (en rouge) et à pH = 4,65 (en noir). L'ajout de Na_2S à la solution à 2 M HCl entraîne la formation de bleu de méthylène alors qu'aucun signal de Wurster's red n'est détecté (en bleu).

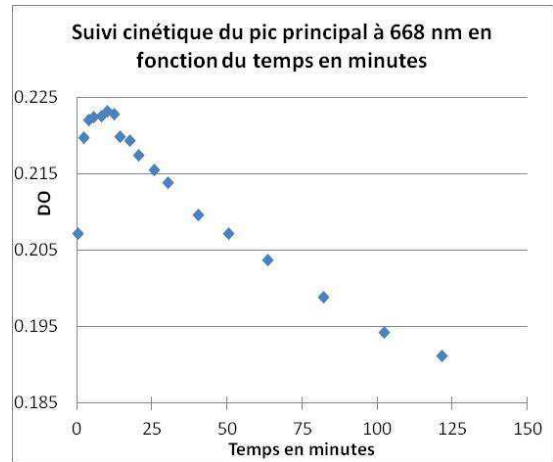
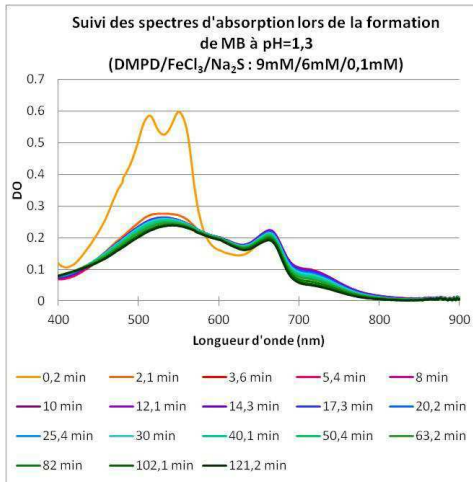
Nos efforts seront concentrés sur la possibilité d'incorporer la quinonediimine dans les monolithes tout en évitant son hydrolyse en Qm_a et autres sous-produits. Mais avant, il nous reste à vérifier la formation du bleu de méthylène et sa stabilité aux pH d'intérêt.

IV.5. Etude de la réaction en solution de la DMPD oxydée par le FeCl_3 avec des sulfures

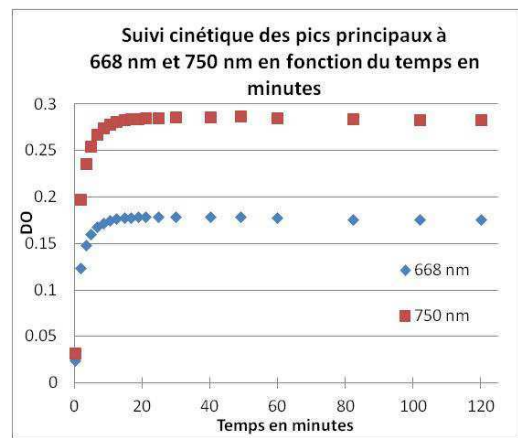
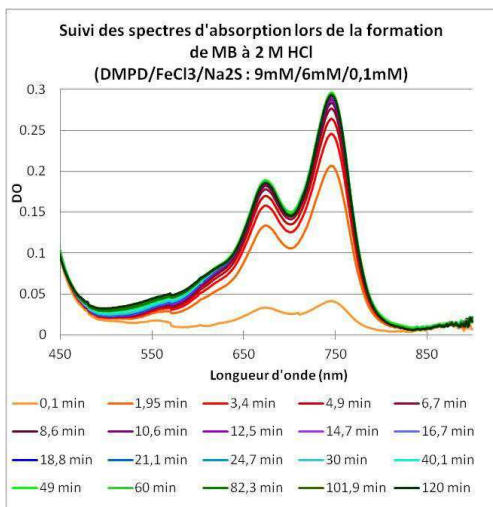
IV.5.1. Etude de la réaction en solution de la DMPD oxydée par FeCl_3 avec l'anion disulfure (Na_2S)

IV.5.1.a. Etude de la réaction en solution diluée

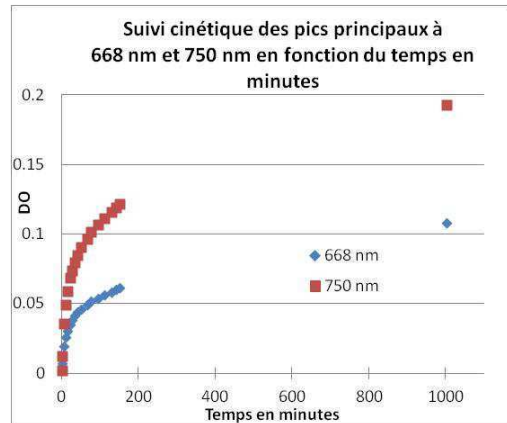
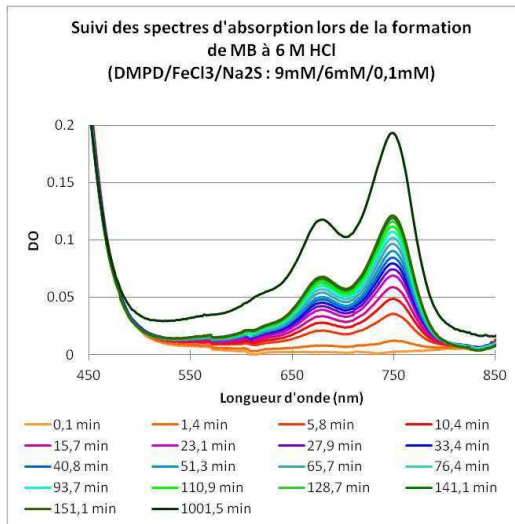
La formation de bleu de méthylène en solution est étudiée pour différentes concentrations d'acide chlorhydrique (10^{-1} M, 2 M et 6 M HCl, Figure 53). Le choix de la stœchiométrie entre les réactifs se porte sur un excès de molécule sonde (QD) par rapport à la cible (H_2S). En effet, on souhaite avoir une cinétique du premier ordre pour que la vitesse de formation du MB soit proportionnelle à la concentration en H_2S . La QD est formée à partir de DMPD oxydée par FeCl_3 . Afin de connaître la quantité de QD formée, un défaut de FeCl_3 est utilisé. Les concentrations utilisées sont $[\text{DMPD}] = 9 \text{ mM}$; $[\text{FeCl}_3] = 6 \text{ mM}$ et $[\text{Na}_2\text{S}] = 0,1 \text{ mM}$. La stœchiométrie entre les réactifs est donc DMPD / FeCl_3 / Na_2S : 90 / 60 / 1 ce qui revient à un rapport QD / Na_2S de 30 / 1.



(a)



(b)



(c)

Figure 53 : Formation de bleu de méthylène à partir du mélange DMPD/FeCl₃/Na₂S : 90/60/1 à différentes concentrations d'HCl. Evolution spectrale en fonction du temps et suivi cinétique des pics du MB. (a) à pH=1 ; (b) à 2 M HCl ; (c) à 6 M HCl.

A pH = 1, la réaction de formation de MB est très rapide et une concentration maximale de MB est obtenue dès 10 minutes (Figure 53(a)). Seule la forme MB⁺ est observée à 668 nm. A t = 0,2 minutes, les pics caractéristiques à 515 nm et 550 nm du Wurster's red apparaissent et disparaissent rapidement du fait de l'instabilité de cette espèce à pH = 1. Une large bande d'absorption centrée autour de 540 nm est observée pour la première fois. L'étude d'oxydation d'une solution de DMPD par FeCl₃ menée au paragraphe §IV.4.1. se déroule en milieu dilué, ce qui explique qu'un tel pic à 540 nm n'ait pas été observé auparavant. A pH = 1, la QD s'hydrolyse rapidement pour donner de nombreux sous-produits qui pourraient présenter un pic d'absorption à 540 nm. Notons que le MB formé n'est pas stable dans le temps.

A 2 M HCl, la réaction de formation de MB est rapide (Figure 53(b)). En effet, le temps nécessaire pour atteindre 95% du plateau de DO (t_{95%}) est de 8 minutes (Tableau 9). Le rendement est déterminé à partir du rapport :

$$\text{Rdt} = (n(\text{MB}^+) + n(\text{MBH}^{2+})) / n(\text{Na}_2\text{S})$$

n(MB⁺) et n(MBH²⁺) étant le nombre de moles de chaque espèce formée dans la solution, déterminé à partir des absorptions à 668 nm et 750 nm, respectivement.

Le rendement en MB obtenu à 2 M HCl est de 20,3%, valeur supérieure au rendement à pH = 1 (8,8%).

Lorsque la réaction de formation de MB est réalisée en milieu très acide (HCl 6 M), la réaction est très lente et le plateau n'est toujours pas atteint au bout de 16 heures de suivi cinétique (Figure 53(c)).

Stœchiométrie DMPD/FeCl ₃ /Na ₂ S : 90/60/1 [DMPD] = 9 mM ; [FeCl ₃] = 6 mM ; [Na ₂ S] = 0,1 mM		
pH=1 rdt = 8,8 % t _{95%} < 2 minutes	[HCl]=2M rdt = 20,3 % t _{95%} = 8 minutes	[HCl]=6M rdt = 12,7 % (à t= 16 heures) t _{95%} > 3 heures

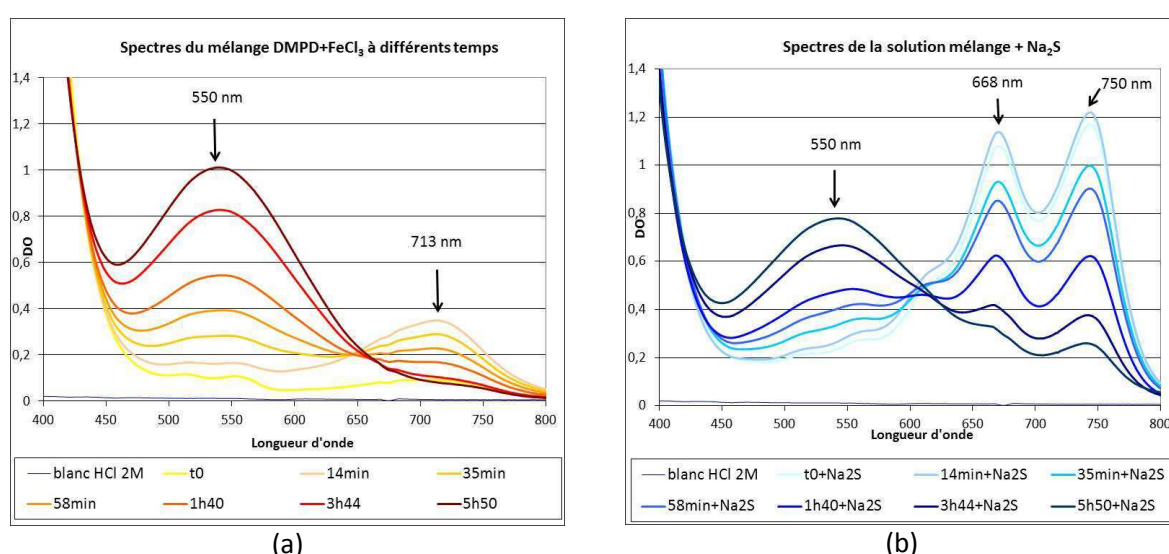
Tableau 9 : Tableau récapitulatif des résultats obtenus pour la formation de MB à différentes concentrations d'HCl. Le rendement r est calculé par rapport à Na₂S ; t_{95%} est le temps écoulé avant d'atteindre 95% de la DO maximale.

Une acidité de 2 M HCl est retenue comme condition de réaction car elle permet d'obtenir à la fois un bon rendement (20,3%) et un temps de réponse court (t_{95%} = 8 minutes). A noter cependant, qu'avec une telle acidité dans le milieu, MB est à la fois présent sous la forme MB⁺ et MBH²⁺ (cette dernière forme n'est pas fluorescente, Figure 23). Détecter le MB en fluorescence est possible à pH = 1, où MB⁺ est la forme prépondérante. A ce pH, la réaction est très rapide (t_{95%} < 2 minutes) mais présente un mauvais rendement (8,8%). La détermination du rendement quantique du MB permettra de conclure si une détection en fluorescence et envisageable ou non.

IV.5.1.b. Etude d'une solution concentrée en DMPD et FeCl_3 et de sa réactivité vis-à-vis de Na_2S

Les capteurs destinés à la détection du sulfure d'hydrogène seront dopés avec une concentration maximale de molécule sonde afin d'augmenter sa sensibilité. Cependant, les sous-produits d'oxydation pouvant être nombreux et absorbants, l'étude d'une solution de DMPD oxydée par le FeCl_3 à fortes concentrations est réalisée (Figure 54(a)). En effet, la coloration d'une solution aqueuse préparée à partir de DMPD (30 mM), FeCl_3 (20 mM) et HCl (2 M) évolue du jaune, à l'orange, au vert, au marron puis au bordeaux.

4 mL de la solution (20 mL de DMPD + 20 mL de FeCl_3) sont régulièrement prélevés et mélangés à 2 mL de Na_2S à 0,33 mM. Le spectre du mélange est collecté en fonction du temps (Figure 54(b)).



(a)

(b)

Echantillon	Rendement par rapport à Na_2S
t0+ Na_2S	29.6%
14min+ Na_2S	31.0%
35min+ Na_2S	25.3%
58min+ Na_2S	23.0%
1h40+ Na_2S	16.3%
3h44+ Na_2S	10.3%
5h50+ Na_2S	7.4%

(c)

Figure 54 : Etude d'une solution concentrée de DMPD oxydée par FeCl_3 [DMPD]=30mM, [FeCl_3]=20mM et [Na_2S]=0,33mM. (a) Evolution spectrale au cours du temps ; (b) révélation de la présence de MB^+ et MBH^{2+} par ajout de Na_2S à la solution de DMPD oxydée ; (c) Rendement en bleu de méthylène.

Lors de l'oxydation de la DMPD par FeCl_3 , une bande d'absorption centrée à 713 nm apparaît, qui confère à la solution une couleur verte. Le pic à 713 nm augmente rapidement durant les 15 premières minutes puis diminue progressivement jusqu'à disparaître au profit d'une espèce absorbant à 550 nm. La présence d'un point isobestique à 650 nm laisse

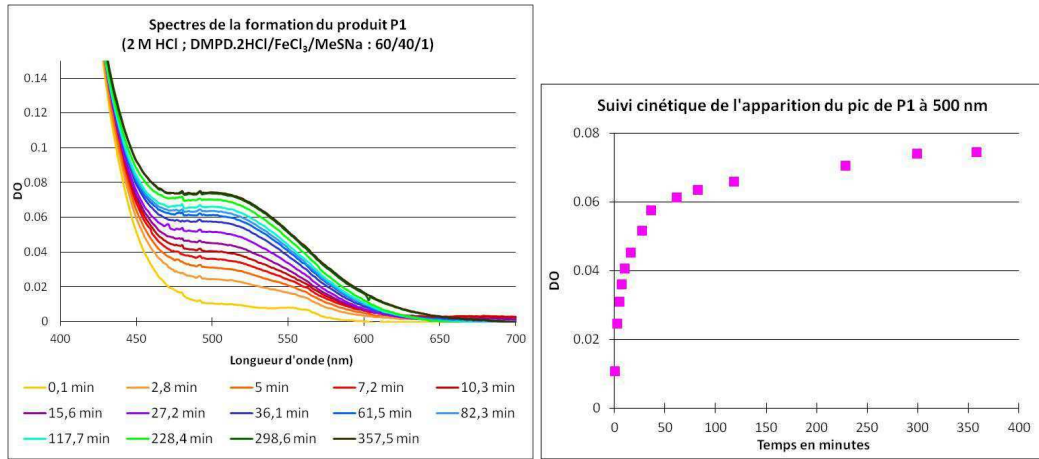
penser que l'espèce à 713 nm donne naissance à l'espèce absorbant à 550 nm. Une bande similaire, centrée autour de 540 nm, a été observée à pH = 1 pour des solutions de DMPD à 9 mM et de FeCl₃ à 6 mM (§IV.5.1.a).

L'espèce absorbant à 713 nm pourrait être du Bindschedler's green (4,4'-bis(diméthylamino)diphénylamine). Le Bindschedler's green correspond au composé XV de la Figure 37, qui est le produit de condensation d'une molécule de Qm_a avec une molécule de DMPD. D'après la littérature, le Bindschedler's green (BG) présente un pic d'absorption à $\lambda = 725$ nm dans l'eau [201] et à $\lambda = 709$ nm dans 3 M d'acide sulfurique [202], ce qui est cohérent avec le maximum d'absorption observé à $\lambda = 713$ nm puisque la concentration en acide chlorhydrique dans la solution est de 2 M. Il possède un fort coefficient d'extinction molaire de $\epsilon_{727\text{nm}} = 78\,000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. [203] De plus, BG est instable aux pH inférieurs à 1 [204] car il subit une hydrolyse qui conduit à la formation de benzoquinone et de N,N-diméthylaniline. [201] Cette réaction n'a pas lieu dans nos conditions expérimentales car la présence d'un point isobestique indique l'évolution de BG vers une autre espèce absorbante dans le visible, ne correspondant ni à la benzoquinone ni à la N,N-diméthylaniline, ces derniers absorbant dans l'UV. Lors de l'introduction de Na₂S dans les prélèvements, la formation de MB⁺ et MBH²⁺ est toujours observée. Le rendement de formation de MB est meilleur en travaillant avec des solutions de réactifs plus concentrées (29,6% contre 20,3% avec des solutions plus diluées) mais il dépend toujours du temps de prélèvement. La variation du rendement de formation de MB⁺ et MBH²⁺ semble suivre l'évolution de BG vers l'espèce absorbante à 550 nm. Ce résultat indique que le précurseur de BG est également celui de MB⁺ et MBH²⁺ et que ces deux réactions sont en compétition et confirme une fois de plus la présence de QD comme intermédiaire primaire de la réaction. Bien que nous n'ayons pas pu identifier la nature de l'espèce absorbant à 550 nm, cette expérience nous a permis de montrer qu'il faudra éviter des concentrations élevées de DMPD pour s'affranchir de cette réaction parasite.

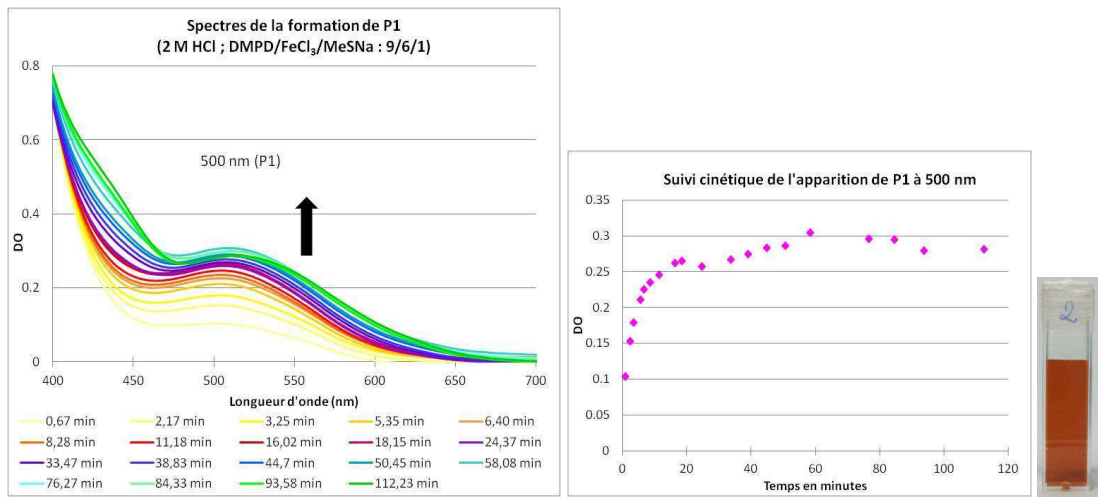
La DMPD est également connue pour réagir avec les alcane-thiol pour former des produits absorbant à d'autres longueurs d'onde que MB⁺ et MBH²⁺. Leur réactivité en milieu très acide n'a jamais été investiguée. Nous nous proposons donc d'étudier la réactivité de DMPD vis-à-vis de MeSH dans les solutions aqueuses très acides (2 M HCl).

IV.5.2. Etude de la réaction en solution de la DMPD oxydée par le FeCl₃ avec MeSH

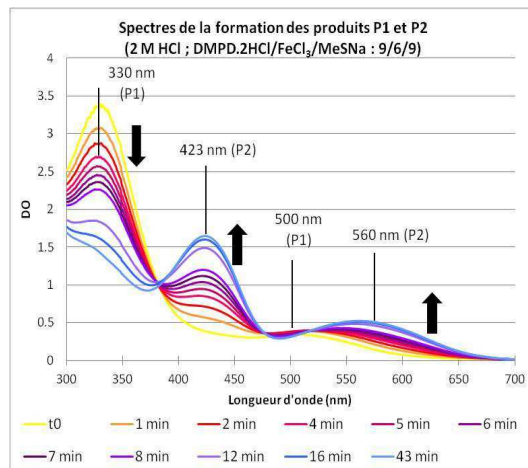
La réaction d'une solution de DMPD oxydée par FeCl₃ avec le méthanethiol (MeSH) est étudiée à 2 M HCl pour différentes stœchiométries de réactifs (Figure 55).



(a)



(b)



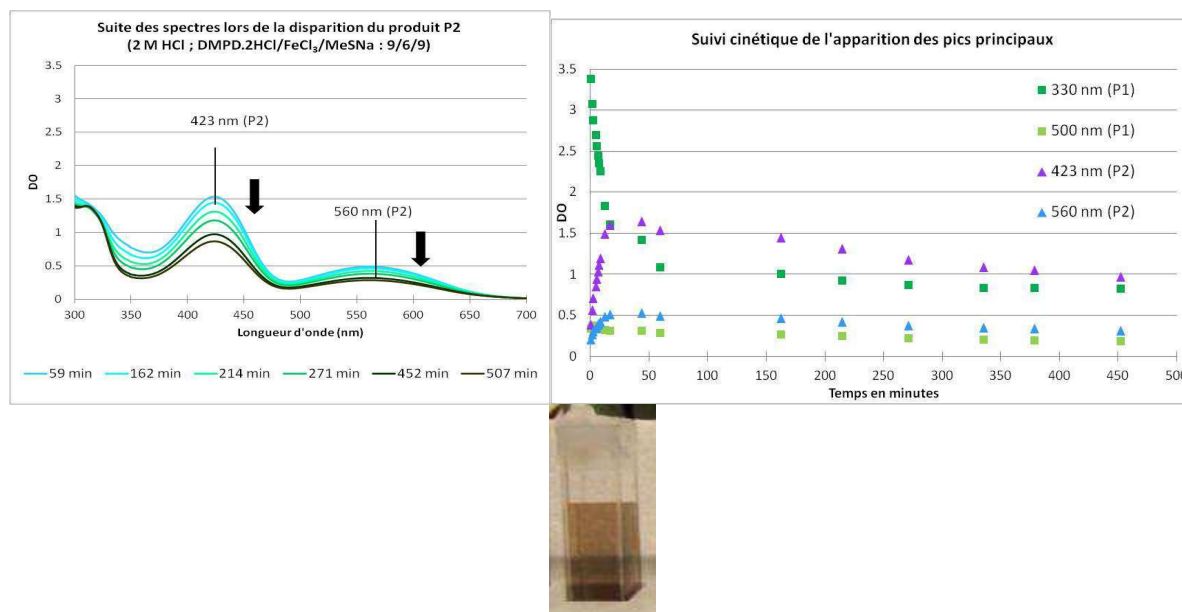


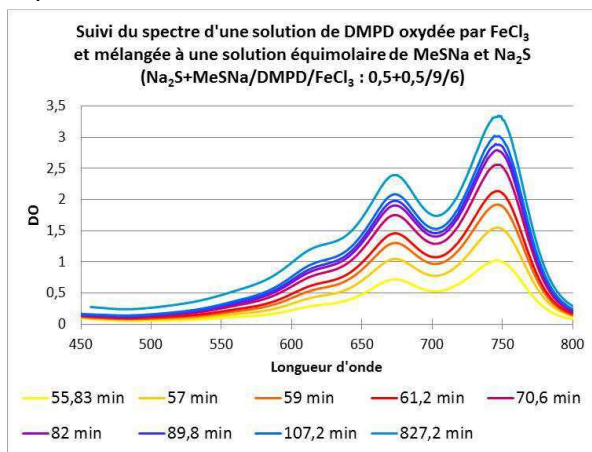
Figure 55 : Etude de la réactivité d'une solution de DMPD oxydée par FeCl_3 à 2M HCl avec le méthanethiol. Evolution spectrale en fonction du temps et suivi cinétique de la bande d'absorption centrée à 500 nm. (a) DMPD/ FeCl_3 /MeSNa : 6 mM/4 mM/0,1 mM, $t_{95\%}$ =50minutes ; (b) DMPD/ FeCl_3 /MeSNa : 9 mM/6 mM/1 mM, $t_{95\%}$ =20minutes ; (c) DMPD/ FeCl_3 /MeSNa : 9 mM/6 mM/9 mM.

Le méthanethiol réagit avec la quinonediimine pour former un produit (P1) qui absorbe à 330 et 500 nm. D'après la littérature, l'addition du méthanethiol se ferait en position ortho de la fonction amine de la DMPD et P1 correspondrait à la 2-méthylthio-4-N,N-diméthyl-phénylènediamine (Figure 29(b)). Cependant, aucune caractérisation n'a été réalisée. Si le méthanethiol est introduit en excès (1,5 éq de MeSNa pour 1 éq de QD), un produit secondaire, P2, est formé. En effet, dans la Figure 55(c), on observe l'évolution de P1 au profit de P2 qui présente 3 bandes d'absorption centrées à 315 nm, 423 nm et 560 nm. On note la présence de points isobestiques à 380 nm et à 477 nm, caractéristiques de l'évolution de P1 vers P2. P2 disparaît lentement au cours du temps et on n'observe pas d'autres espèces dans le domaine de longueur d'onde exploré. La nature de P2 n'est pas élucidée. Une hypothèse serait une seconde addition de MeSH sur P1 en position ortho du groupement amine avec la formation d'un composé de structure symétrique et dont les propriétés optiques devraient être voisines de celles de P1. Cette hypothèse n'a pu être étayée.

IV.5.3. Etude de la réaction de compétition entre MeSH et H_2S en solution

La quinonediimine réagit avec Na_2S et MeSNa. La question se pose de savoir si la détection peut être perturbée lorsque ces deux analytes sont présents simultanément. Pour le savoir, un mélange équimolaire de Na_2S et de MeSNa est introduit dans une solution de DMPD oxydée par FeCl_3 (Figure 56).

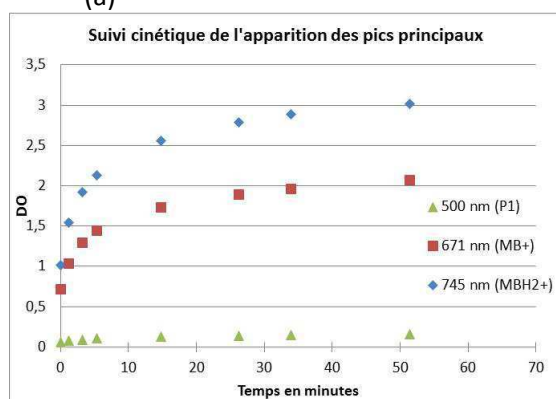
Seuls les pics caractéristiques du bleu de méthylène à 671 nm et 745 nm sont visibles. Aucune absorption n'apparaît à 500 nm. Au contact de la solution acide, Na_2S se transforme en H_2S qui réagit plus rapidement que MeSH (formé à partir de MeSNa). La détection en liquide d' H_2S n'est pas gênée par la présence de MeSH . En revanche, H_2S représentera un interférent pour de la détection de MeSH .



(a)



(b)



(c)

Figure 56 : Essai de détection simultanée de Na_2S et de MeSNa par ajout d'un mélange équimolaire de Na_2S et de MeSNa ($500 \mu\text{L}$ à 1 mM) à une solution de DMPD oxydée par FeCl_3 (1 mL de DMPD 9 mM + 1 mL de FeCl_3 6 mM). (a) Evolution du spectre d'absorption en fonction du temps ; (b) photo de la solution ayant réagi majoritairement avec Na_2S pour former du MB ; (c) suivi cinétique des pics caractéristiques de MB et P1.

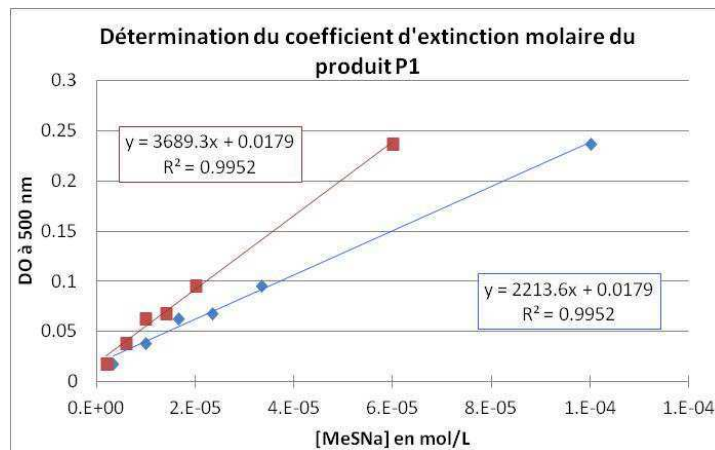
IV.6. Caractérisation de P1, produit de la réaction entre la QD et MeSH

Afin de pouvoir quantifier les résultats de détection du méthaneithiol, il est nécessaire d'estimer son coefficient d'extinction molaire. Ne disposant pas de la forme commerciale de P1, le coefficient d'extinction molaire sera déterminé en faisant réagir des concentrations croissantes et connues de MeSNa avec une solution de DMPD oxydée par FeCl_3 . Pendant toute l'étude, DMPD et FeCl_3 sont en excès par rapport à MeSNa ($[\text{DMPD}] = 9 \text{ mM}$ et $[\text{FeCl}_3] = 6 \text{ mM}$). La concentration de MeSH varie entre $10 \mu\text{M}$ et $300 \mu\text{M}$.

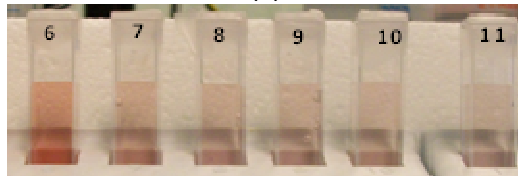
Le coefficient d'extinction molaire de P1 est déterminé en reportant la valeur de la DO du pic à 500 nm en fonction de la concentration introduite de MeSNa (Figure 57). Ce calcul prend comme hypothèse que la stœchiométrie de la réaction est de 1 DMPD pour 1

MeSH. On considère la réaction totale et donc $n_{P1 \text{ final}} = n_{\text{MeSH initiale}}$. Le coefficient d'extinction molaire $\epsilon_{(P1, 500\text{nm})}$ est de $2\,210 \pm 480 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

Cette valeur est sous-estimée car on considère que tout le méthane-thiol a réagi. Or, pendant la réalisation de l'expérience, une forte odeur de méthane-thiol a été sentie près de la hotte aspirante, témoignant de la diffusion et perte de MeSH dans la phase gazeuse. Cette perte peut être évaluée avec la constante de Henry ($H_{cc} = 0,123$ pour MeSH). En supposant que l'équilibre est atteint dans un flacon entre la phase liquide (3 mL) et la phase gazeuse (3 mL) et que chaque flacon n'est ouvert qu'une seule fois, pour des concentrations comprises entre $10 \mu\text{M}$ et $300 \mu\text{M}$ de MeSH, la quantité de MeSH perdue dans la phase gazeuse représente 30 % de la concentration introduite initialement. Si l'on considère que seulement 60% du MeSH introduit en solution a réagi, le coefficient d'extinction molaire de P1 à 500 nm devient $3690 \pm 1350 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.



(a)



(b)

Figure 57 : (a) Détermination du coefficient d'extinction molaire du produit P1 à 500 nm ; (b) Photos des essais utilisés pour la détermination ; le produit P1 est rouge et absorbe à 500 nm.

Nous avons montré qu'il est possible de former du bleu de méthylène et de la 2-méthylthio-4-N,N-diméthyl-phénylènediamine en solution à différents pH et pour des stœchiométries différentes des réactifs. Nous allons maintenant mettre à profit ces connaissances pour élaborer les capteurs solides de H_2S et de MeSH.

V. Synthèse et caractérisation des monolithes

V.1. Synthèse de monolithes

Les capteurs sont synthétisés par voie sol-gel. Cette réaction consiste en l'élaboration de verre poreux à partir d'une solution liquide de précurseurs, les alcoxydes de silicium.

L'ajout d'eau à des précurseurs alcoxydes de silicium entraîne une réaction d'hydrolyse (souvent catalysée par ajout de base ou d'acide) formant des fonctions silanols. Ces fonctions se condensent ensuite pour créer des ponts siloxanes entre les molécules. Des polymères en suspension sont ainsi obtenus. La polycondensation de ces colloïdes aboutit à une structure réticulée de type gel dont le maillage est rempli de solvant. Lors de son évaporation, le maillage se rétracte pour donner un verre poreux, le xérogel. Les vitesses d'hydrolyse et de condensation déterminent la porosité du matériau. Les proportions entre les réactifs, les concentrations, la température et le pH sont donc des paramètres importants. La nature des substituants des précurseurs alcoxydes influe également.

Pour la préparation de capteurs destinés à détecter les sulfures, le précurseur choisi est le tétraméthylorthosilicate (TMOS). Etant peu miscible à l'eau, l'éthanol est choisi pour jouer le rôle de co-solvant. Le rapport molaire choisi entre le précurseur tétraméthylorthosilicate, l'éthanol (EtOH) et l'eau est le suivant : TMOS/EtOH/eau = 1/4/4. La molécule sonde étant soluble dans l'eau, elle est incorporée dans la phase aqueuse (Annexe 9.1). Le sol est finalement coulé dans des moules pour obtenir des monolithes, c'est-à-dire un solide de forme parallélépipédique autosupporté. Ses dimensions finales sont 0,9 x 0,5 x 0,2 cm pour une solution initiale de sol de 1 mL.

V.1.1. Synthèse de monolithes pour la détection d'H₂S et de MeSH

D'après les résultats obtenus en solution, quatre paramètres doivent être étudiés pour le dopage et l'élaboration du capteur.

- ✓ **La concentration en DMPD** : elle doit être la plus importante possible afin d'augmenter la sensibilité du capteur.
- ✓ **La concentration en FeCl₃** : la molécule sonde étant la quinonediimine, il est nécessaire d'oxyder la DMPD. Une oxydation par l'oxygène de l'air et non pas FeCl₃ est envisagée afin de limiter la formation de sous-produits. Différentes concentrations en FeCl₃ seront également essayées.
- ✓ **La concentration en HCl** : la présence d'ions H⁺ stabilise la durée de vie de la quinonediimine. Cependant, le bleu de méthylène se dégrade dans des conditions trop acides, supérieures à 6M HCl.
- ✓ **L'atmosphère lors de la synthèse et du séchage des monolithes** : Une synthèse sous argon dans une boîte à gants prévient la sonde d'une oxydation induite par l'oxygène de l'air et permet un meilleur contrôle de l'oxydation en introduisant FeCl₃.

Plusieurs formulations de sols sont préparées prenant en compte ces paramètres afin de synthétiser une large gamme de monolithes (Tableau 10). Leur aspect en fin de séchage et leur réactivité vis-à-vis de H₂S sont ensuite évalués (voir VI.1.).

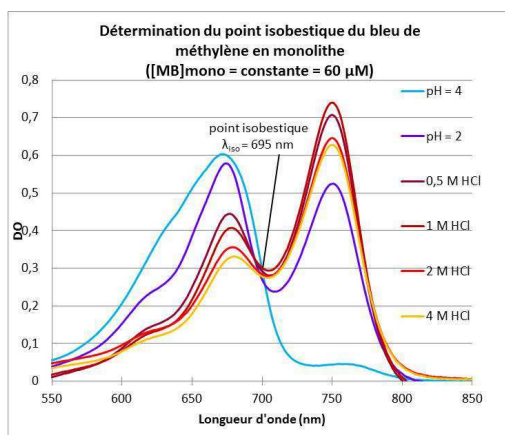
N° synthèse	[DMPD] _{mono} (en mol.dm ⁻³)	[FeCl ₃] _{mono} (en mol.dm ⁻³)	[HCl] _{mono} (en mol.dm ⁻³)	Atmosphère	Couleur en fin de séchage
Ratio molaire TMOS/EtOH/H ₂ O : 1/4/4					
1	0,69	0	2	Argon	Rose pâle
2	0,4	0	2	Argon	Rose pâle
3	0,05	0	2	Argon	Rose pâle
4	0,58	0	2	Argon	Rose pâle
7	0,05	0	10 ^{-4,6}	Argon	jaune
8	0,05	0,005	2	Argon	Orange
9	0,05	0,025	2	Argon	jaune
10	0,05	0,11	2	Argon	Marron clair
11	0,64	0,0384	2	Argon	Marron
12	0,487	0,1461	2	Argon	Marron opaque
13	0,23	0,322	2	Argon	Noir
14	0,23	0,0161	2	Argon	Marron clair
15	0,23	0,0828	2	Argon	Marron opaque
16	0,004	0	10 ⁻²	Argon	Rose pâle
17	0,23	0,0345	2	Argon	Orange
18	0,23	0,0575	2	Argon	Orange
19	0,05	0,05	2	Argon	Orange
20	0,1	0,05	2	Argon	Orange
21	0,1	0,03	2	Argon	Orange
22	0,1	0,01	2	Argon	Orange
23	0,2	0,1	2	Argon	Marron
24	0,2	0,06	2	Argon	Orange
25	0,2	0,02	2	Argon	Orange
26	0	0	2	Argon	Incolore
27	0,05	0,025	0,1	Argon	Noir
28	0,05	0,005	0,1	Argon	Marron foncé
29	0,01	0,005	0,1	Argon	Orange pâle
30	0,01	0,001	0,1	Argon	Orange pâle
31	0,05	0	0,1	Argon	jaune
32	0	0	0,1	Argon	Incolore
33	0,01	0,005	10-2	Argon	Rose
34	0	0	10-2	Argon	Incolore
Exp1	0,009	0,006	0,1	Air	Violet opaque
Exp2	0,009	0,006	2	Air	Jaune
Exp3	0,009	0,006	6	Air	Jaune
Exp4	0,009	0	0,1	Air	Incolore
Exp5	0,009	0	2	Air	Incolore
Exp6	0,009	0	6	Air	Incolore

Tableau 10 : Tableau récapitulatif des monolithes synthétisés. Les concentrations sont données en mol.dm⁻³, une fois le monolithe sec.

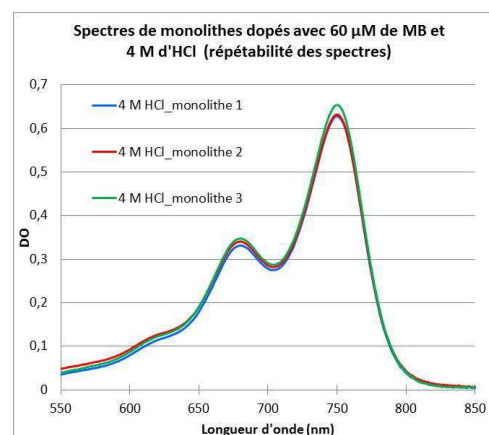
Quelle que soit la concentration en acide chlorhydrique, le sol met entre 2 et 4 jours pour geler. Le séchage dure une semaine. L'influence d'une synthèse et d'un séchage à l'air pouvant accélérer les phénomènes d'oxydation et de vieillissement du capteur est évaluée avec les formulations Exp1 à Exp6. La quinonediimine étant sensible à l'hydrolyse sur des intervalles de temps supérieurs à la journée, et ayant montré que de fortes concentrations d'acide chlorhydrique améliorent sa stabilité, les formulations N° 8 à 28 sont dopées avec 2 M HCl. Elles diffèrent par leur concentration en DMPD (50 à 640 mM) et le ratio de DMPD par rapport à FeCl_3 ($0,5 < [\text{DMPD}]/[\text{FeCl}_3] < 20$). Ces monolithes, s'ils détectent H_2S , favorisent la forme MBH^{2+} qui n'est pas fluorescente. Des monolithes dopés avec une concentration d'HCl de 0,1 M et 0,01 M sont préparés afin de favoriser la forme MB^+ , fluorescente, en cas de détection d' H_2S . Ils contiennent entre 10 et 50 mM de DMPD et présentent un ratio $[\text{DMPD}]/[\text{FeCl}_3]$ compris entre 2 et 10 (formulations N° 27 à 30 et 33). L'oxygène contenu dans l'air pouvant jouer le rôle d'oxydant, des monolithes dopés avec 50 à 690 mM de DMPD et ne contenant pas de FeCl_3 sont préparés (formulations N°1 à 7, 16 et 31).

V.1.2. Monolithes dopés au bleu de méthylène commercial

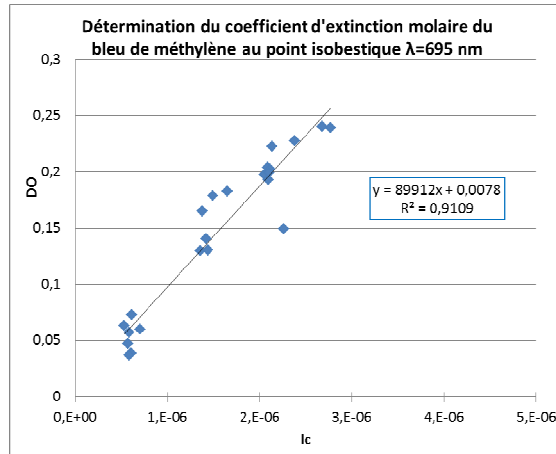
Afin de connaître les propriétés spectrales du bleu de méthylène dans un monolithe, des matrices dopées au bleu de méthylène commercial sont préparées. On souhaite, en effet, vérifier que les propriétés optiques du bleu de méthylène adsorbé à la surface des pores n'ont pas changé. En solution, les maxima d'absorption sont observés à $\lambda_{\text{MB}^+, \text{sol}} = 668 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{MBH}_2^+, \text{sol}} = 750 \text{ nm}$. Les maxima d'absorption du bleu de méthylène dans le monolithe sont légèrement déplacés : $\lambda_{\text{MB}^+, \text{mono}} = 678 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{MBH}_2^+, \text{mono}} = 745 \text{ nm}$. Pour autant, le spectre n'est pas profondément modifié.



(a)



(b)



(c)

Figure 58 : (a) détermination du point isobestique du bleu de méthylène dans une matrice sol-gel ; (b) détermination du coefficient d'extinction molaire du bleu de méthylène à 695 nm.

Le point isobestique entre les formes MB^+ et MBH^{2+} est obtenu en préparant des monolithes de concentration constante en bleu de méthylène et à concentrations variables d'acide chlorhydrique (Figure 58(a)). Les spectres de monolithes contenant une même concentration en acide chlorhydrique se superposent, montrant ainsi la répétabilité de la synthèse d'un monolithe à un autre (Figure 58(b)). Un décalage de 13 nm est observé entre le point isobestique en solution ($\lambda_{iso,sol} = 682$ nm) et le point isobestique en monolithe ($\lambda_{iso,monol} = 695$ nm). Le coefficient d'extinction molaire du MB à cette longueur d'onde est déterminé : $\epsilon_{MB,695nm,2MHCl} = 89\,900 \pm 17\,000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (Annexe 6.3, Figure 58(c)). Il permettra par la suite de quantifier le bleu de méthylène formé au sein des pores des monolithes.

V.2. Caractérisation de monolithes dopés de réactifs

Les monolithes sont des matériaux poreux. Il convient donc de caractériser leur surface spécifique ainsi que la répartition de la taille des pores. Cette caractérisation est effectuée en acquérant l'isotherme d'adsorption-désorption de l'azote, à la température de l'azote liquide, d'un échantillon de monolithe broyé. L'isotherme est analysé à l'aide de diverses méthodes analytiques qui permettent de déduire la surface spécifique d'adsorption, le volume poreux et la distribution des tailles de pores. (voir Annexe 10.1).

V.2.1. Détermination des paramètres de porosité des monolithes

Les isothermes d'adsorption de l'azote ont été établis pour les monolithes issus des diverses formulations par voie sol-gel. Les surfaces spécifiques d'adsorption ont été déduites en utilisant la méthode analytique de Brunauer, Emmet et Taylor (BET (Tableau 11)). La répartition de la taille des pores en surface d'adsorption et en volume poreux est déterminée à l'aide la théorie de la fonctionnelle de densité (DFT) et permet de connaître la

quantité de micropores ($2 < \text{diamètre} < 20 \text{ \AA}$), de mésopores ($20 < \text{diamètre} < 500 \text{ \AA}$) et de macropores ($500 \text{ \AA} < \text{diamètre}$). Les analyses de porosité sont réitérées à différentes températures de dégazage afin de savoir si cette dernière a un impact sur les mesures. Une température élevée pourrait détruire les molécules de DMPD, ce qui induirait un espace vide plus grand dans les pores et peut conduire à des valeurs de surface spécifique plus élevées. Une isotherme de type I correspondant à un matériau essentiellement microporeux est observée pour l'ensemble des monolithes préparés à partir de TMOS (TMOS/EtOH/eau : 1/4/4). Quel que soit le dopage en molécule sonde, les monolithes présentent de la micro- et un début de mésoporosité (taille des pores allant de 8 \AA à 28 \AA). Le dopage en DMPD est trop faible pour avoir une influence sur la taille des pores. La surface spécifique moyenne est de $700 \text{ m}^2/\text{g}$.

Echantillon	[DMPD]	[HCl]	T° de dégazage (temps de dégazage en rampe à vide + temps de dégazage sur le BET)	Surface spécifique	Taille de pores en surface (2 modes centrés sur ...)
F	270mM	2M	150°C (24 h + 4 h)	500m ² /g	11 et 28 Å
B	10mM	2M	25°C (2,6 h)	770 m ² /g	10 et 27 Å
B	10mM	2M	150°C (3,4 h)	730 m ² /g	12 et 28 Å
E	0,9mM	2M	25°C (3 h)	675 m ² /g	10 et 32 Å
E	0,9mM	2M	120°C (3 h)	800 m ² /g	10 et 32 Å
D	0	2M	25°C (24 h)	590 m ² /g	15 et 25 Å
D	0	2M	120°C (2,5 h)	710 m ² /g	10 et 25 Å

Tableau 11 : Récapitulatif des monolithes analysés en BET et résultats obtenus.

La connaissance de la porosité des monolithes apporte une information sur la taille des molécules pouvant entrer dans les pores ou au contraire, pouvant être discriminées. Ces résultats permettent aussi d'estimer le nombre de molécules de DMPD par pore dans un monolithe.

V.2.2. Estimation du nombre de pores efficaces dans un monolithe

Par hypothèse, assimilons la porosité du monolithe dopé à un ensemble de sphères de divers diamètres et dont la surface peut être tapissée de molécules de DMPD (Figure 59). La distribution de taille des pores est assimilée à une distribution discrète de taille de sphères (de diamètres D_i). Considérons la classe des sphères de diamètre D_i . L'ensemble des sphères de cette classe (qui sont au nombre de N_i) développe une surface A_i qui est recouverte de n_i mol de DMPD. Soit A_0 , la surface développée totale d'un monolithe, la

quantité totale de DMPD contenue dans un monolithe est connue expérimentalement et vaut n_{tot} .

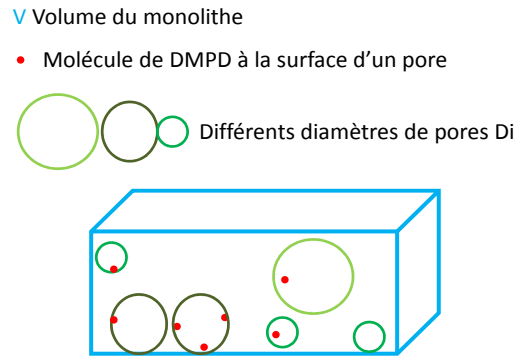


Figure 59 : Schéma représentant un monolithe et les paramètres utilisés dans la loi de Poisson

Estimer le nombre de molécules de DMPD par pore équivaut à tirer au sort une sphère incluant x molécules de DMPD et à répéter plusieurs fois cette épreuve. Chaque épreuve est indépendante ce qui signifie que le contenu x d'une sphère est indépendant du contenu des sphères voisines.

La modélisation du problème revient à utiliser une loi de Poisson de paramètre $n_{moy,i}$ qui décrit la probabilité de présence de x molécules de DMPD dans un pore de taille D_i . Cette loi s'exprime selon l'Équation 2.

$$P(x) = \frac{(n_{moy,i})^x e^{-n_{moy,i}}}{x!}$$

Équation 2 : Loi de Poisson ; $P(x)$ représente la probabilité d'avoir x molécules de DMPD dans un pore de taille D_i , et $n_{moy,i}$ est le nombre moyen de molécules de DMPD à la surface d'un pore de taille D_i .

Le paramètre $n_{moy,i}$ de la loi de Poisson représente le nombre moyen de molécules de DMPD à la surface de tous les pores de taille D_i qui sont au nombre de N_i , sachant que l'ensemble de la surface développée par tous les pores de taille D_i , A_i , est recouverte de n_i molécules de DMPD. Le paramètre $n_{moy,i}$ peut s'écrire de la façon suivante :

$$n_{moy,i} = \frac{n_i}{N_i} \quad \text{Avec } n_i = \frac{n_{tot} \times A_i}{A_0} \quad \text{et } N_i = \frac{A_i}{\pi D_i^2}$$

Soit :

$$n_{moy,i} = \frac{n_i}{N_i} = \frac{n_{tot} \times A_i}{A_0} \times \frac{\pi D_i^2}{A_i} = n_{tot} \frac{\pi D_i^2}{A_0}$$

La loi de Poisson peut donc être calculée en utilisant la formule :

$$P(x) = \frac{\left(n_{tot} \frac{\pi D_i^2}{A_0} \right)^x e^{-\left(n_{tot} \frac{\pi D_i^2}{A_0} \right)}}{x!}$$

où les paramètres D_i et A_0 sont renseignés par l'analyse BET et le paramètre n_{tot} est connu expérimentalement.

Les deux premiers termes $P(0)$ et $P(1)$ correspondent à la probabilité d'avoir un pore vide et un pore contenant une molécule de DMPD pour une taille D_i de pores (Tableau 12). La probabilité d'avoir au moins deux molécules de DMPD par pore soit $P(x \geq 2)$ nous intéresse pour la détection d' H_2S car deux molécules de DMPD sont nécessaires pour former du bleu de méthylène. Un pore est dit efficace pour la capture et réaction avec H_2S , lorsqu'il comporte au moins deux molécules de DMPD (cases de fond vert). D'après le Tableau 12, il faut des pores d'au moins 40 Å pour avoir au moins la moitié des pores du monolithe qui soient efficaces.

Par ailleurs, pour la capture de MeSH, une seule molécule par pore est une condition suffisante (cases écrites en bleu). Il faut une taille de pore d'au moins 26 Å pour avoir au moins la moitié des pores du monolithe qui soient efficaces $P(x \geq 1)$.

Pour une classe de pores de taille D_i , le nombre de pores contenant x molécules de DMPD est $N_i \times P(x)$. D'après la loi de Poisson, sur les $2,53 \cdot 10^{19}$ pores contenus dans un monolithe de formulation N°9 synthétisé dans le cadre de la thèse, $2,09 \cdot 10^{19}$ sont vides (soit 83%). Les monolithes contiennent au maximum 2,8% de pores efficaces pour H_2S et 17,3 % de pores efficaces pour MeSH. Ce résultat laisse présager une meilleure réactivité du monolithe avec MeSH plutôt qu'avec H_2S .

Di (m)	A _i (m ²)	N _i	n moy. _i (molecules)	P(x=0)	P(x=1)	P(x=2)	P (x ≥ 1)	P (x ≥ 2)	nb de pores vides	nb de pores efficaces H ₂ S	nb de pores efficaces MeSH
1.0E-09	3.43E+01	1.09E+19	1.1E-01	0.899	0.096	0.005	0.101	0.005	9.83E+18	5.78E+16	1.10E+18
1.1E-09	1.15E+01	3.03E+18	1.3E-01	0.879	0.113	0.007	0.121	0.008	2.66E+18	2.31E+16	3.66E+17
1.2E-09	1.60E+01	3.54E+18	1.5E-01	0.858	0.132	0.010	0.142	0.011	3.03E+18	3.76E+16	5.03E+17
1.3E-09	2.55E+00	4.80E+17	1.8E-01	0.835	0.150	0.014	0.165	0.014	4.01E+17	6.89E+15	7.90E+16
1.4E-09	1.07E+01	1.73E+18	2.1E-01	0.812	0.169	0.018	0.188	0.019	1.41E+18	3.29E+16	3.26E+17
1.5E-09	9.98E+00	1.41E+18	2.4E-01	0.787	0.189	0.023	0.213	0.024	1.11E+18	3.46E+16	3.01E+17
1.6E-09	3.85E+00	4.79E+17	2.7E-01	0.761	0.208	0.028	0.239	0.031	3.65E+17	1.49E+16	1.14E+17
1.7E-09	4.51E+00	4.97E+17	3.1E-01	0.735	0.226	0.035	0.265	0.039	3.66E+17	1.92E+16	1.32E+17
1.8E-09	6.80E+00	6.69E+17	3.4E-01	0.708	0.244	0.042	0.292	0.047	4.74E+17	3.17E+16	1.95E+17
1.9E-09	1.66E+00	1.46E+17	3.8E-01	0.681	0.262	0.050	0.319	0.057	9.96E+16	8.40E+15	4.67E+16
2.0E-09	1.82E+00	1.45E+17	4.3E-01	0.653	0.278	0.059	0.347	0.069	9.45E+16	9.93E+15	5.02E+16
2.1E-09	2.87E+00	2.07E+17	4.7E-01	0.625	0.294	0.069	0.375	0.081	1.29E+17	1.68E+16	7.75E+16
2.2E-09	3.81E+00	2.51E+17	5.2E-01	0.597	0.308	0.079	0.403	0.095	1.50E+17	2.38E+16	1.01E+17
2.3E-09	3.80E+00	2.29E+17	5.6E-01	0.569	0.321	0.090	0.431	0.110	1.30E+17	2.51E+16	9.85E+16
2.4E-09	3.29E+00	1.82E+17	6.1E-01	0.542	0.332	0.102	0.458	0.126	9.84E+16	2.29E+16	8.33E+16
2.5E-09	2.96E+00	1.51E+17	6.7E-01	0.514	0.342	0.114	0.486	0.144	7.75E+16	2.17E+16	7.33E+16
2.6E-09	3.64E+00	1.71E+17	7.2E-01	0.487	0.350	0.126	0.513	0.163	8.35E+16	2.79E+16	8.80E+16
2.7E-09	4.54E+00	1.98E+17	7.8E-01	0.460	0.357	0.139	0.540	0.183	9.12E+16	3.62E+16	1.07E+17
2.8E-09	3.88E+00	1.58E+17	8.3E-01	0.434	0.362	0.151	0.566	0.204	6.85E+16	3.21E+16	8.93E+16
2.9E-09	3.08E+00	1.17E+17	9.0E-01	0.408	0.366	0.164	0.592	0.226	4.76E+16	2.63E+16	6.90E+16
3.0E-09	2.65E+00	9.39E+16	9.6E-01	0.384	0.368	0.176	0.616	0.249	3.60E+16	2.34E+16	5.79E+16
3.1E-09	2.43E+00	8.05E+16	1.0E+00	0.359	0.368	0.188	0.641	0.273	2.89E+16	2.19E+16	5.15E+16
3.2E-09	2.33E+00	7.23E+16	1.1E+00	0.336	0.366	0.200	0.664	0.297	2.43E+16	2.15E+16	4.80E+16
3.3E-09	2.17E+00	6.33E+16	1.2E+00	0.314	0.364	0.211	0.686	0.323	1.99E+16	2.04E+16	4.35E+16
3.4E-09	1.68E+00	4.64E+16	1.2E+00	0.292	0.359	0.221	0.708	0.348	1.36E+16	1.62E+16	3.28E+16
3.5E-09	1.24E+00	3.23E+16	1.3E+00	0.271	0.354	0.231	0.729	0.375	8.77E+15	1.21E+16	2.36E+16
3.6E-09	1.40E+00	3.44E+16	1.4E+00	0.252	0.347	0.240	0.748	0.401	8.65E+15	1.38E+16	2.57E+16
3.7E-09	1.29E+00	3.00E+16	1.5E+00	0.233	0.339	0.247	0.767	0.428	6.99E+15	1.28E+16	2.30E+16
3.8E-09	1.05E+00	2.31E+16	1.5E+00	0.215	0.330	0.254	0.785	0.455	4.97E+15	1.05E+16	1.81E+16
3.9E-09	7.77E-01	1.63E+16	1.6E+00	0.198	0.321	0.260	0.802	0.481	3.22E+15	7.83E+15	1.31E+16
4.0E-09	5.74E-01	1.14E+16	1.7E+00	0.182	0.310	0.264	0.818	0.508	2.08E+15	5.80E+15	9.34E+15
4.1E-09	5.18E-01	9.81E+15	1.8E+00	0.167	0.299	0.267	0.833	0.534	1.64E+15	5.24E+15	8.17E+15
4.2E-09	4.67E-01	8.42E+15	1.9E+00	0.153	0.287	0.270	0.847	0.560	1.29E+15	4.72E+15	7.14E+15
4.3E-09	1.66E-01	2.86E+15	2.0E+00	0.140	0.275	0.271	0.860	0.585	3.99E+14	1.67E+15	2.46E+15
4.4E-09	1.45E-01	2.38E+15	2.1E+00	0.127	0.262	0.270	0.873	0.610	3.03E+14	1.45E+15	2.08E+15
4.5E-09	1.22E-01	1.91E+15	2.2E+00	0.116	0.250	0.269	0.884	0.635	2.21E+14	1.21E+15	1.69E+15
4.6E-09	1.12E-01	1.68E+15	2.3E+00	0.105	0.237	0.267	0.895	0.658	1.77E+14	1.11E+15	1.51E+15
4.7E-09	1.05E-01	1.51E+15	2.4E+00	0.095	0.224	0.263	0.905	0.681	1.43E+14	1.03E+15	1.36E+15
4.8E-09	9.04E-02	1.25E+15	2.5E+00	0.086	0.211	0.259	0.914	0.703	1.08E+14	8.79E+14	1.14E+15
4.9E-09	8.59E-02	1.14E+15	2.6E+00	0.078	0.198	0.254	0.922	0.724	8.84E+13	8.25E+14	1.05E+15
5.0E-09	8.40E-02	1.07E+15	2.7E+00	0.070	0.186	0.247	0.930	0.744	7.47E+13	7.97E+14	9.96E+14
	Nombre total de pores	2.53E+19						TOTAL	2.09E+19	6.95E+17	4.38E+18
								%	82.7	2.8	17.3

Tableau 12 : Loi de Poisson de paramètre n moy,_i appliquée dans le cadre d'un monolithe de formule N°9, de surface spécifique A₀ 111 m² et contenant n_{tot} = 6,25 μmol de DMPD.

VI. Exposition de monolithes et caractérisation sur banc de dilution

Avant d'exposer les monolithes à de faibles concentrations de sulfures au moyen d'un banc de dilution, une étude préliminaire utilisant de fortes concentrations (≈ 1000 ppm) est réalisée. Les sulfures (H_2S ou MeSH) sont préparés par addition d'acide chlorhydrique concentré sur des solutions contenant le sel de dérivés sulfurés (Na_2S ou MeSNa). Les sulfures ainsi formés présentent des constantes de Henry élevées (Tableau 13). A l'équilibre, selon la loi de Henry, le nombre total de mol $n_{i,tot}$ de composés sulfurés ($i : H_2S$ ou MeSH) est réparti entre la phase gazeuse dont la concentration est $C_{i,G}$ et la phase liquide dont la concentration est $C_{i,L}$. Les formules de monolithes les plus sensibles seront ainsi sélectionnées afin d'être étudiées avec un banc de dilution de gaz. Le laboratoire dispose d'une bouteille de sulfure d'hydrogène à 3 ppm et d'une bouteille de méthane-thiol à 2 ppm.

	H_2S	MeSH
Solubilité dans l'eau	0,11 mol/L [105]	0,48 mol/L [205]
Constante de Henry H_{CC}	$4,09 \cdot 10^{-1}$ [206]	$1,23 \cdot 10^{-1}$ [206]

Tableau 13 : Caractéristiques physiques de H_2S et MeSH.

Le calcul utilisé pour la détermination de la teneur en H_2S en ppm dans la phase gazeuse lors de l'étude préliminaire est le suivant. Soit x , la fraction molaire de i en phase gazeuse, $(1-x)$ représente alors la fraction molaire de i en phase aqueuse.

A l'équilibre, la constante de Henry H_{CC} , sans dimension, s'écrit :

$$H_{CC} = \frac{C_{i,G}}{C_{i,L}} \quad \text{où} \quad C_{i,G} = \frac{x \cdot n_{i,tot}}{V_G} \quad \text{et} \quad C_{i,L} = \frac{(1-x) \cdot n_{i,tot}}{V_L}$$

La concentration en phase gazeuse du composé i s'écrit alors :

$$C_{i,G} = H_{CC} \cdot C_{i,L} \Leftrightarrow \frac{x \cdot n_{i,tot}}{V_G} = H_{CC} \cdot \frac{(1-x) \cdot n_{i,tot}}{V_L} \Leftrightarrow \frac{x}{1-x} = H_{CC} \cdot \frac{V_G}{V_L}$$

Après réarrangement, il est possible d'exprimer x en fonction de la constante de Henry H_{CC} et des volumes des phases gazeuse V_G et liquide V_L :

$$x = \frac{H_{CC} \cdot \frac{V_G}{V_L}}{1 + H_{CC} \cdot \frac{V_G}{V_L}} ; H_{CC} \text{ est sans dimension, } V_G \text{ et } V_L \text{ sont exprimés dans la même unité (L)}$$

Connaissant x , la fraction molaire de composé i dans la phase gazeuse, il est possible de calculer la teneur en i présente dans la phase gaz d'un système.

$$teneur = \frac{V_{i,G}}{V_G} = \frac{x \cdot n_{i,tot} \cdot V_m}{V_G}$$

Où

$V_{i,G}$ est le volume de composé i dans la phase gaz (en L)

V_G est le volume de la phase gaz (en L)

V_m est le volume molaire du composé i sous forme gazeuse. $V_m = 24 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ à 20°C et 1 atm.

VI.1. Exposition des monolithes à de fortes concentrations d'H₂S

Le monolithe N°27 n'est pas exposé car il est opaque. La DMPD introduite à 50 mM dans ce monolithe ([FeCl₃] = 25 mM) s'est oxydée rapidement, le WR et la QD étant instables lorsque le milieu est peu acide ([HCl] = 0,1 M). Les autres monolithes sont incolores à roses lorsqu'ils ne contiennent pas de FeCl₃ et jaunes à oranges lorsqu'ils en contiennent.

Les monolithes sont exposés à des teneurs d'H₂S gazeux comprises entre 900 ppm et 2250 ppm pendant 24 heures. Les conditions expérimentales utilisées sont décrites dans l'Annexe 11.1. Le spectre d'absorption des monolithes est acquis avant et après exposition (Annexe 12). Quatre comportements différents sont observés :

- **Cas 1 : Aucune variation spectrale n'est observée.** Le monolithe ne détecte pas H₂S. Ce cas est observé pour les monolithes N°1-7, 16 et 31 qui ont été formulés sans FeCl₃. Il est aussi observé pour les monolithes synthétisés puis séchés à l'air (Exp 1 à 6) et les monolithes contenant peu d'HCl (0,01M<[HCl]<0,1M) c'est-à-dire les monolithes N°29,30 et 33. Ces résultats montrent que l'absence de FeCl₃ dans la formulation et la présence d'oxygène nuisent à la détection.
- **Cas 2 : Le monolithe devient si opaque qu'il transmet trop peu de lumière pour l'acquisition d'un spectre.** Aucune conclusion ne peut être avancée quant à la réactivité du monolithe. Ce cas est observé pour les monolithes dopés avec une concentration de DMPD supérieure à 0,2 M ($2 < [DMPD]/[FeCl_3] < 10$) soit les formulations N°12,15,17,18,23,24 et 25.
- **Cas 3 : Le monolithe devient vert pâle et son spectre d'absorption présente, après exposition, un pic à 715 nm** (Tableau 14). Ce pic correspondant à la formation d'un produit de dégradation de la DMPD est observé pour le spectre des monolithes acides N° 19,20,21 et 22 contenant entre 50 et 100 mM de DMPD et $2 < [DMPD]/[FeCl_3] < 10$ ainsi que pour le monolithe N°28 dopé à 0,1 M d'HCl ([DMPD]=50 mM et $[DMPD]/[FeCl_3] = 10$). Ces conditions ne permettent pas de détecter H₂S.
- **Cas 4 : Les monolithes réagissent avec H₂S, deviennent vert émeraude et du MB est formé** (Tableau 14). Le spectre d'absorption des monolithes acides N°8,9,10,11 et 14 présente les deux pics caractéristiques à 678 nm et 745 nm du MB. Ces monolithes contiennent entre 50 et 640 mM de DMPD et un rapport $[DMPD]/[FeCl_3]$ situé entre 2 et 14. Les monolithes qui réagissent avec H₂S présentent des pics à 678 nm et 745 nm qui sont caractéristiques du bleu de méthylène. En superposant les spectres du bleu de méthylène en solution (forme commerciale ou synthétisée en solution aqueuse à 2M HCl) et en monolithe (dopage au bleu de méthylène commercial ou réaction de détection), on observe que les pics des formes MB⁺ et MBH²⁺ absorbent aux mêmes longueurs d'ondes (Figure 60).

Monolithe contenant FeCl ₃ avant exposition	Monolithe ayant détecté H ₂ S	Monolithe ayant subi une réaction de dégradation
		

Tableau 14 : Photos d'un monolithe avant et après exposition à H₂S selon qu'il réagit pour former du MB ou subit une réaction de dégradation

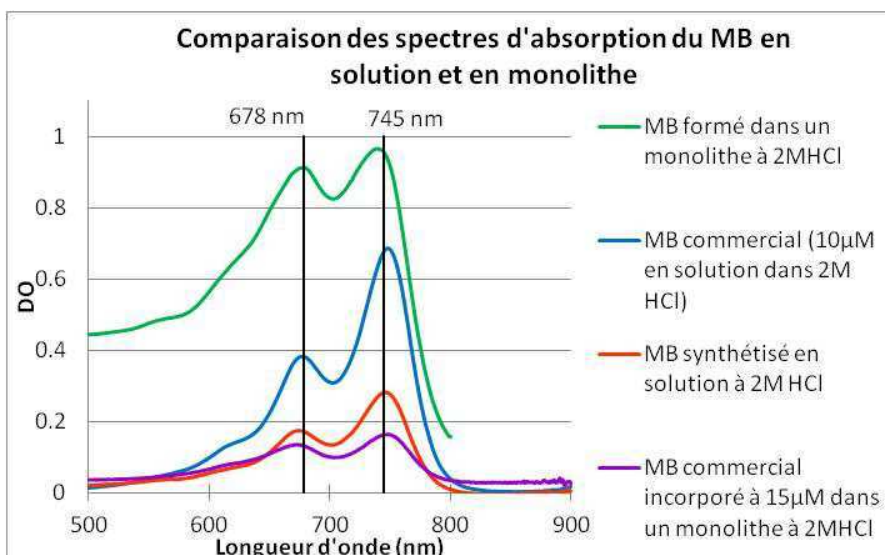


Figure 60 : spectres du bleu de méthylène en solution et en monolithe. La molécule synthétisée in-situ absorbe aux mêmes longueurs d'onde que la forme commerciale.

Les 4 cas observés permettent de définir les conditions de réaction nécessaires à l'obtention d'un monolithe détectant H_2S à savoir, une synthèse sous atmosphère d'argon, une concentration en acide chlorhydrique de 2 M et la présence de $FeCl_3$. La réactivité des monolithes exposés à H_2S est obtenue pour une concentration en DMPD comprise entre 50 et 640 mM et un rapport $[DMPD]/[FeCl_3]$ situé entre 2 et 14. Plus la concentration en molécule sonde est élevée ($[DMPD]_{mono} > 0,1 M$) et plus le capteur est sensible. Cependant, s'ils sont exposés à de trop fortes concentrations d' H_2S , les capteurs réagissent fortement et les colorations sont trop intenses pour pouvoir être mesurées. Le monolithe ayant apporté les résultats les plus satisfaisants est le monolithe de formulation N°9. Cette formulation est utilisée pour une étude plus approfondie.

Etude approfondie de monolithes préparés à partir de la formulation N°9

Différentes expositions de monolithes de formule N°9 ont mis en évidence l'influence de deux paramètres importants que sont le type de montage utilisé et la présence d'humidité. Le sulfure d'hydrogène (H_2S) est généré à partir d'une solution d'ion disulfure (S^{2-}) dans NaOH additionnée d'acide chlorhydrique concentré. L'ajout d'acide chlorhydrique à une solution de Na_2S dans NaOH entraîne non seulement la formation d' H_2S (à partir de Na_2S) mais aussi la formation de molécules d'eau (à partir de NaOH).

La réactivité du monolithe n°9 a été comparée en fonction du récipient (en plastique ou en verre) utilisé pour l'exposition. Le sulfure d'hydrogène s'adsorbe facilement sur les parois. Il interagit davantage avec le plastique qu'avec le verre qui est inerte et non poreux. Une partie du sulfure d'hydrogène généré en phase gazeuse s'adsorbe sur les parois du récipient. C'est autant d'analyte perdu qui ne réagira pas avec le monolithe. La Figure 61(a) montre qu'un monolithe exposé à 1080 ppm de H_2S gazeux dans un récipient en verre de

20 mL contenant 9 μ L d'une solution de Na_2S 0,1 M, réagit pour former du bleu de méthylène.

En revanche, un monolithe exposé à 1200 ppm H_2S dans un récipient en plastique de 50 mL contenant 25 μ L d'une solution de Na_2S 0,1 M, présente une bande d'absorption centrée à 715 nm. Ce pic à 715 nm ne correspond pas à une réaction de détection d' H_2S car ce pic apparaît indifféremment selon que le récipient d'exposition contient du sulfure d'hydrogène ou non (Figure 61(a)). Ce pic pourrait être attribué à la formation de Bindschedler's green ($\lambda_{\text{max, eau}} = 725 \text{ nm}$ [201] et $\lambda_{\text{max, 3M H}_2\text{SO}_4} = 709 \text{ nm}$ [202]) qui est le produit de condensation d'une molécule de Qm_a et de DMPD. L'apparition de ce pic peut être assimilée à un signe d'une dégradation de la molécule sonde.

L'oxygène présent dans l'air n'est pas responsable de cette dégradation. Une exposition sous atmosphère d'argon donne le même résultat. En revanche, ce pic de dégradation n'est observé qu'en présence d'humidité (Figure 61(b)). L'humidité de l'air ne suffit pas à dégrader la molécule sonde car le spectre d'un monolithe laissé à l'air du laboratoire (HR = 55%) pendant 24 heures ne change pas. En revanche, la dégradation n'est observée que lorsque l'humidité est supérieure à HR = 55%. Cette situation se produit lors de l'ajout d'HCl à une solution de NaOH qui produit des molécules d'eau. L'introduction de desséchant comme le chlorure de calcium (CaCl_2) permet de remédier à cet inconvénient. Cependant, H_2S a tendance à s'adsorber à la surface des grains de CaCl_2 et la teneur en H_2S se trouve alors modifiée.

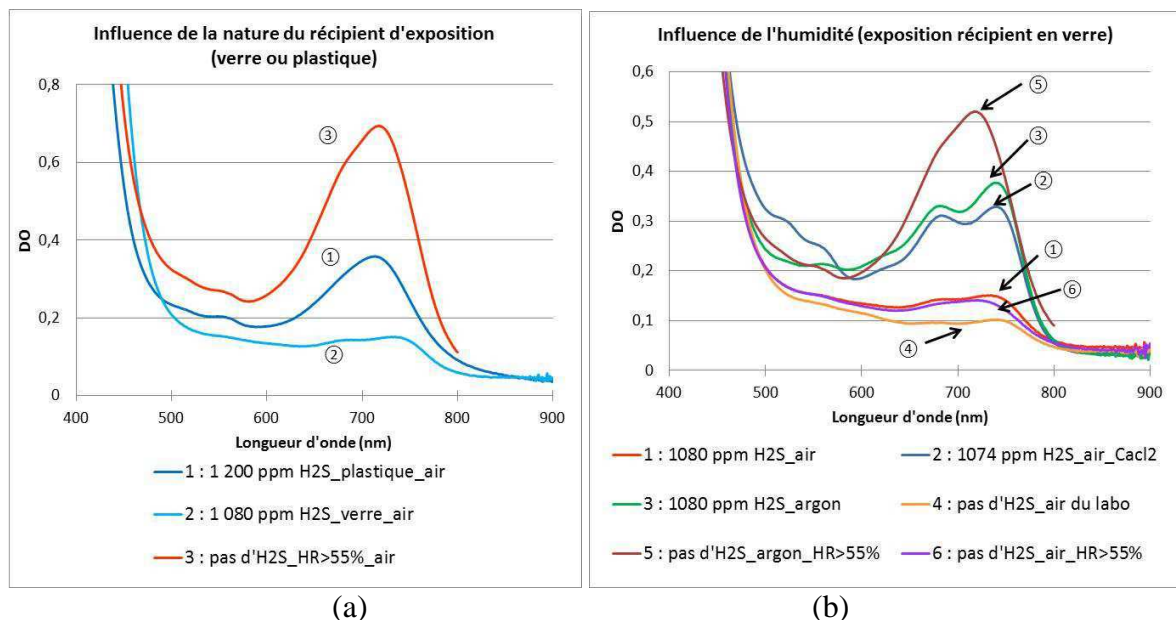


Figure 61 : Etude approfondie de la détection d' H_2S avec le monolithe N°9. (a) Etude de l'influence du récipient (plastique et verre) sur la détection (b) Influence de l'humidité sur la détection dans des récipients en verre sous différentes conditions.

L'étude approfondie de l'exposition du monolithe de formule N°9 permet d'améliorer les conditions d'exposition. Un récipient en verre doit être utilisé. L'oxygène de l'air ne provoque pas de réaction secondaire gênante pour la détection. En revanche, l'humidité est

un interférent important qui entraîne la dégradation de la sonde et l'apparition d'un pic à 715 nm probablement due à la formation de Bindschedler's green. Cette observation nous amène à reconsidérer la réactivité des monolithes de formulation N° 19,20,21 et 22 (cas 2) dont le spectre d'absorption après exposition présentait ce pic à 715 nm. Elle pourra être évaluée à nouveau par exposition à H₂S en présence de desséchant.

Le produit de dégradation n'a pas été caractérisé. Cependant, il pourrait s'agir de Bindschedler's green car le pic à 715 nm est similaire au pic à 713 nm observé en solution lors de l'oxydation de concentrations élevées de DMPD par FeCl₃ (Figure 54). Cette constatation montre qu'il faudrait abaisser la concentration en molécule sonde pour diminuer le risque de dégradation avec cependant le risque de diminuer le nombre de pores efficaces dans le monolithe, ce qui est défavorable à l'efficacité de détection de H₂S.

Pour l'instant, seules les concentrations élevées d'H₂S (supérieures à 1000 ppm) peuvent être détectées.

VI.2. Exposition des monolithes à de fortes concentrations de MeSH

Lors de l'exposition à MeSH, le monolithe N°9 perd sa couleur jaune et devient marron (Tableau 15). L'apparition d'un pic à 560 nm est observée (Figure 62(a)). Il a été montré au paragraphe §IV.5.2. qu'en phase liquide, selon la concentration en méthane-thiol, deux produits P1 et P2 se forment. P1 absorbe à 500 nm tandis que P2 absorbe à 422 nm et 560 nm. En comparant le spectre du monolithe exposé au méthane-thiol et les spectres des produits P1 et P2, il semble que le produit P2 soit formé dans le monolithe (Figure 62(b)).

Cette observation est cohérente avec celle obtenue en solution. Un monolithe N°9 contient 2,5 µmol de QD (Volume du monolithe = 0,1 cm³ ; [DMPD]_{mono} = 50 mM ; [FeCl₃]_{mono} = 25 mM). L'exposition à 1 200 ppm de MeSH équivaut à 2,5 µmol de MeSH (Volume du récipient = 50mL) et celle à 96 300 ppm de MeSH à 650 µmol de MeSH (Volume du récipient = 145 mL). Dans les deux cas, la quantité de MeSH est supérieure ou égale à la quantité de QD (sonde) ; c'est le produit P2 qui est formé.



Monolithe N°9 avant exposition	Monolithe ayant réagi avec MeSH
	

Tableau 15 : Photos du monolithe N°9 avant et après exposition au méthane-thiol.

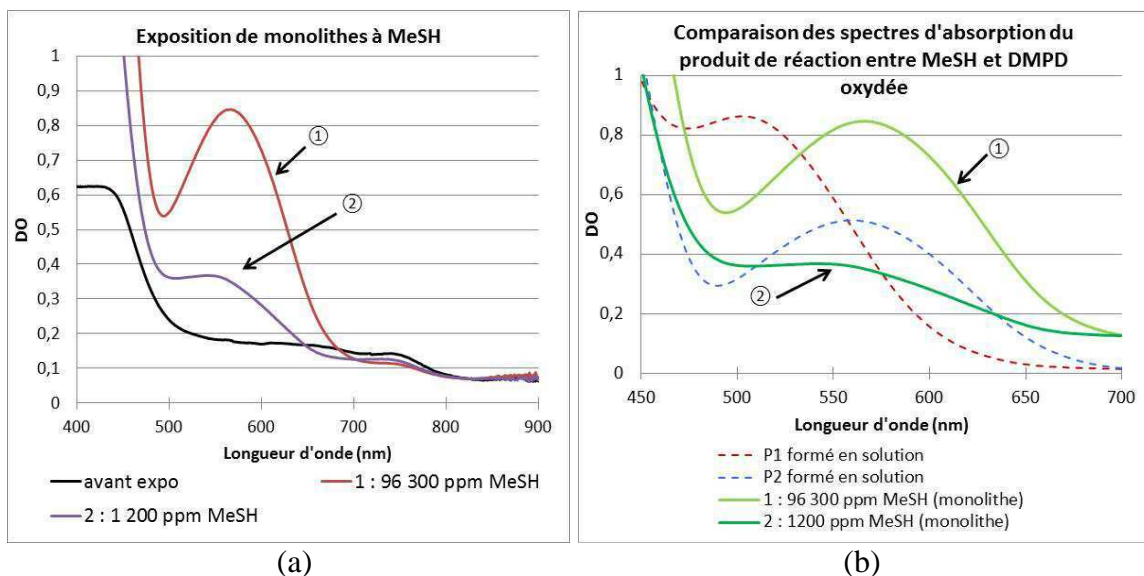


Figure 62 : Exposition d'un monolithe N°9 au méthaneithiol. (a) Spectres du monolithe avant et après exposition à différentes teneurs de MeSH ; (b) Comparaison des spectres obtenus lors de la mise en présence du système (DMPD+FeCl₃) à MeSH, en solution et en monolithe.

VI.3. Exposition de monolithes à H₂S et MeSH

Afin de connaître l'effet de compétition entre H₂S et MeSH, un monolithe de formulation N°9 est exposé simultanément à ces deux gaz. Dans une première expérience, les deux gaz sont à 1073 ppm et dans une seconde expérience, les deux gaz sont à ≈ 52 000 ppm.

A 1073 ppm, la réaction de détection entre en compétition avec la réaction de dégradation. Le pic de dégradation (715 nm) apparaît (Figure 63(a)). En réitérant l'exposition en présence de desséchant (CaCl₂), le monolithe présente un pic à 560 nm correspondant au produit P2 de la réaction avec MeSH. Le pic du MB n'est pas observé. Pour des concentrations encore plus fortes, ≈ 52 000 ppm, le monolithe réagit à la fois avec H₂S et MeSH (Figure 63(b)). Les pics des produits P2 et MB sont observés respectivement à 560 nm et 745 nm.

Lorsque le monolithe est mis en présence de H₂S et MeSH, les deux gaz entrent en compétition. MeSH est majoritairement détecté. Les valeurs de la constante de Henry de MeSH et de H₂S sont proches. (Tableau 13) Or, le méthaneithiol semble présenter une plus grande réactivité que H₂S, alors que l'inverse est observé en solution (Figure 56)

Ce résultat peut être expliqué. Les estimations du nombre de molécules de DMPD par pore ont montré que 2,8% des pores pouvaient accueillir 2 (ou plus de 2) molécules de DMPD et 17,3% des pores pouvaient en accueillir au moins une. Le nombre de pores pouvant servir de nanoréacteur pour MeSH étant plus élevé, la réaction de DMPD oxydé avec MeSH est favorisée. Par ailleurs, la réaction de DMPD avec une seule molécule de H₂S peut également être envisagée. Elle donnerait lieu à la formation du composé V (Figure 30).

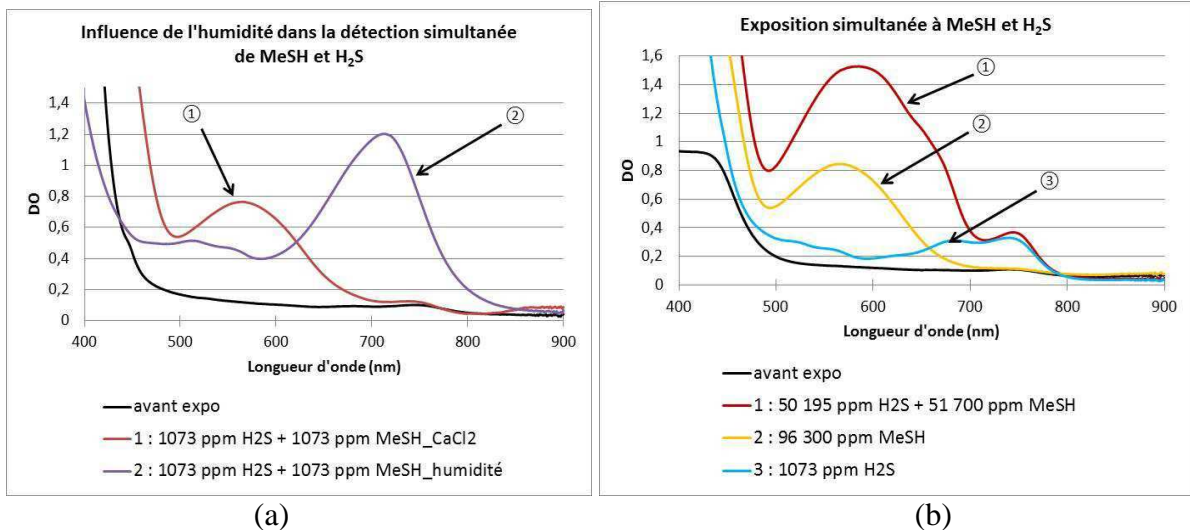


Figure 63 : Exposition simultanée d'un monolithe N°9 à H₂S et à MeSH. (a) à 1073 ppm, la formation du produit final est en compétition avec la réaction de dégradation de QD en présence d'humidité. L'introduction de desséchant permet la détection préférentielle du méthanthiol ; (b) à $\approx 50\ 000$ ppm d'H₂S et $\approx 96\ 000$ ppm de MeSH, les deux produits de détection P2 et MB sont formés.

VI.4. Exposition à de faibles teneurs de H₂S à partir de mélanges gazeux calibrés

VI.4.1. Description du banc de dilution

Le banc de dilution de gaz permet de réaliser deux dilutions successives afin d'atteindre de faibles concentrations d'analyte (Figure 64). Il consiste en une arrivée de gaz porteur, l'azote, qui sert à diluer l'analyte, le sulfure d'hydrogène, disponible en bouteille à 2ppm dans l'azote (150 bars, 2 litres).

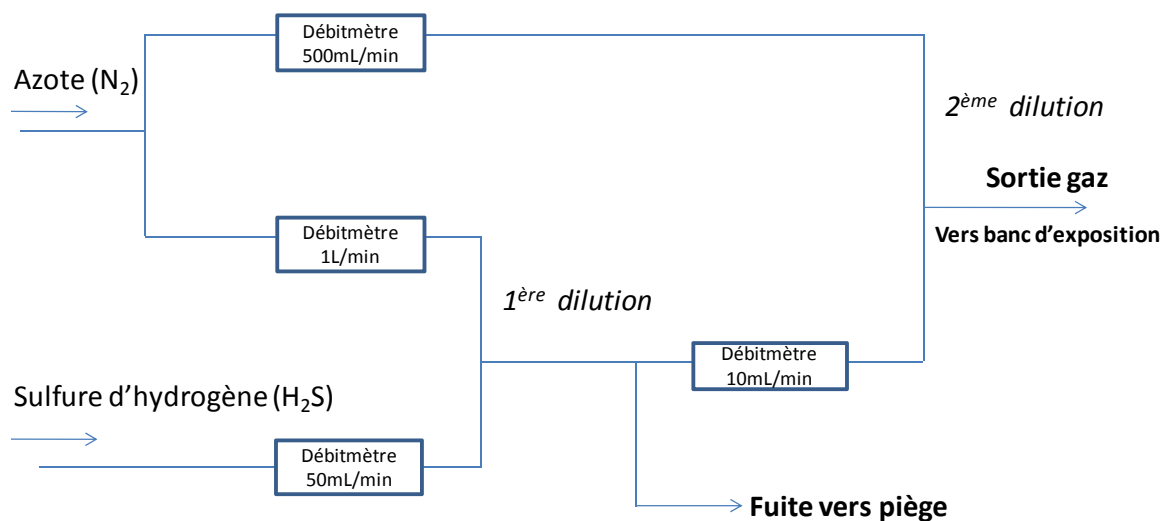
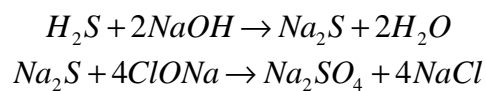


Figure 64 : Schéma de principe du banc double dilution de gaz.

A partir d'une bouteille à 2 ppm d'H₂S, ce banc permet, à débit constant et égal à 100 mL/min, de balayer une gamme de concentrations allant de 0,1 ppb à 1 ppm. La

concentration maximale de 2 ppm peut être étudiée sur un éventail de débit de 1 mL/min à 50 mL/min. La concentration la plus basse de 0,02 ppb est théoriquement obtenue pour un débit de 500 mL/min. Le banc gaz étant équipé de cordons chauffants : la température du gaz peut être contrôlée et un nettoyage à haute température peut être effectué.

La sortie du banc est connectée au banc d'exposition. Il est composé d'une cellule d'exposition en quartz qui contient le monolithe et d'un porte-cellule en delrin noir sur lequel sont fixées des fibres optiques (Figure 65). La première fibre optique est reliée à une lampe deutérium-halogène et permet d'éclairer le monolithe. La deuxième fibre optique est reliée à un spectrophotomètre portable et collecte la lumière transmise à travers le monolithe. Un suivi cinétique de l'évolution du spectre du monolithe peut donc être réalisé (Figure 66). Le flux de gaz sortant du banc gaz traverse la cellule d'exposition contenant le monolithe qui est reliée à un bulleur contenant un mélange de soude et d'eau de javel. Cette solution permet de neutraliser le sulfure d'hydrogène selon l'Équation 3.



Équation 3 : Equation de neutralisation du sulfure d'hydrogène par réaction avec l'eau de javel.

L'ensemble du montage banc gaz et banc d'exposition est piloté par ordinateur.

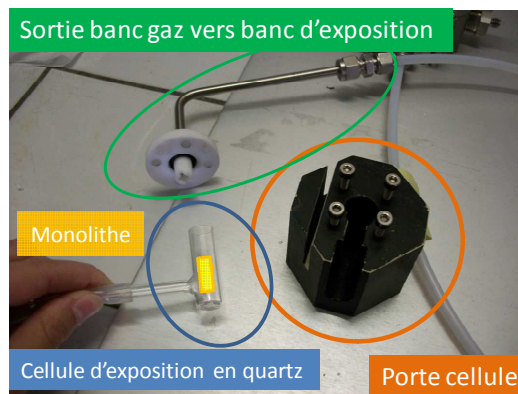


Figure 65 : Photo du porte-cellule pouvant accueillir la cellule d'exposition en quartz. Le monolithe, positionné dans la cellule en quartz, est exposé au flux de mélange gazeux calibré.

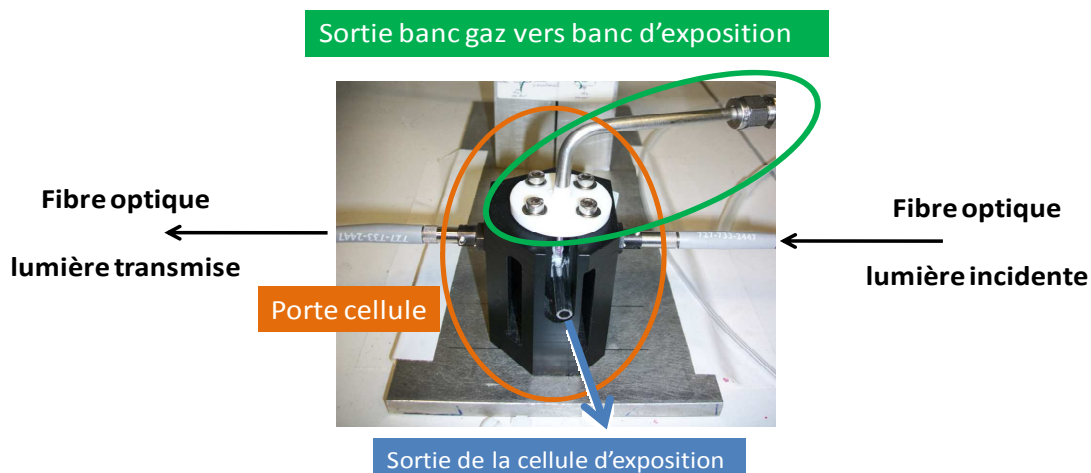


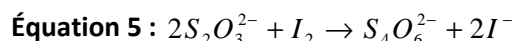
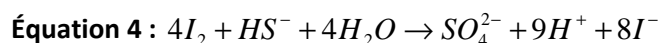
Figure 66 : Photo du porte-cellule. Les fibres optiques sont reliées respectivement à une source de lumière et à un spectrophotomètre portable, qui acquiert régulièrement le spectre du monolithe. Le flux de gaz arrive du banc gaz, traverse la cellule d'exposition dont la sortie est reliée à un bulleur permettant de piéger H₂S.

VI.4.2. Calibration de la bouteille H₂S

Afin de vérifier que la bouteille contient du sulfure d'hydrogène, une bandelette de papier imprégnée d'acétate de plomb est mise en présence d'un faible débit de gaz. Elle noircit, confirmant ainsi que la bouteille contient bien du sulfure d'hydrogène.

Parmi les méthodes de calibration pouvant être mises en œuvre au laboratoire, la méthode de calibration conseillée par l'INRS (Institut National de Recherche et de Sécurité) utilisant la formation de bleu de méthylène a attiré notre attention. Elle met en jeu la précipitation d'H₂S avec du chlorure de cadmium imprégné sur des filtres de quartz que traverse le gaz. Le précipité est ensuite désorbé des filtres par lavage avec une solution de DMPD dans 6 M H₂SO₄. Cette solution est mélangée à du FeCl₃ pour former du bleu de méthylène. Le spectre de la solution contenant le bleu de méthylène est acquis et la valeur de DO à 670 nm est comparée à une courbe d'étalonnage. Cette courbe est tracée à partir de Na₂S introduit à différentes concentrations dans un mélange de DMPD oxydée par FeCl₃. Cette méthode est difficile à mettre en œuvre de manière fiable. En effet, le protocole décrit l'utilisation d'une solution mère dont la concentration est supérieure à 0,1 M. Or, il a été montré plus haut que cette concentration correspond à la limite de solubilité d'H₂S dans l'eau. De plus, Na₂S est dissous dans de l'eau distillée dont le pH avoisine 4. Or, le sulfure d'hydrogène possède deux pKa : un premier correspondant à l'échange d'un proton entre l'ion sulfure S²⁻ et l'ion hydrosulfure HS⁻ et vaut pKa_{S²⁻/HS⁻} > 13 ; le second pKa_{HS⁻/H₂S} = 6,76 [207] correspond à l'échange d'un proton entre l'ion hydrosulfure HS⁻ et le sulfure d'hydrogène H₂S. La dissolution Na₂S dans de l'eau à pH = 4 favorise la formation d'H₂S qui est peu soluble dans l'eau et se volatilise rapidement. La concentration de Na₂S évolue donc à mesure que H₂S formé quitte la solution. La courbe d'étalonnage a été tracée expérimentalement à trois reprises et trois pentes différentes ont été obtenues. Cette méthode n'est donc pas retenue pour calibrer la bouteille d'H₂S.

La méthode classique de titrage d'une solution de sulfure est le dosage indirect au diiode. [208] Un volume connu d'une solution de diiode ($V_{I_2} = 10 \text{ mL}$), de concentration connue (1 mM), est ajouté en excès à l'échantillon de sulfure ($V_{\text{éch}} = 500 \mu\text{L}$) qui est aussitôt réduit en sulfate (Équation 4). L'excès de diiode est ensuite déterminé par titration au thiosulfate de sodium à 1 mM (Équation 5). Connaissant le nombre de mol de diiode introduit dans l'échantillon de sulfure et le nombre de mol de diiode dosé par le thiosulfate, la quantité de sulfure contenue dans l'échantillon peut être calculée.



Cette méthode ne s'applique qu'aux échantillons liquides. Afin de l'utiliser, H_2S est piégé dans une solution de soude sous ses formes HS^- et S^{2-} . Pour ce faire, un flux de gaz est bullé à travers un flacon laveur dans un volume connu de solution de soude, à un débit connu, pendant un temps connu. (Figure 67). La sortie du flacon est reliée vers le piège à NaOH et eau de javel au cas où il resterait du sulfure d'hydrogène dans le flux gazeux.

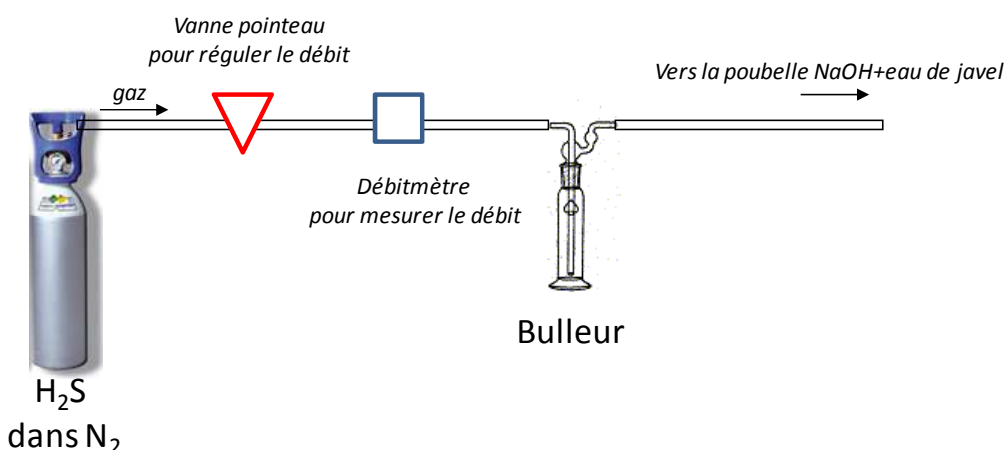


Figure 67 : Montage utilisé pour piéger le sulfure d'hydrogène issu de la bouteille et l'analyser.

Une autre méthode de détermination des sulfures utilisant le diiode est la spectrophotométrie. En effet, il est possible de déterminer le diiode ayant oxydé le sulfure d'hydrogène (Équation 4) en suivant spectralement la diminution du pic d'absorption de I_2 à 451 nm. Le spectre d'une solution de I_2 à 1 mM ($V_{I_2} = 10 \text{ mL}$) est acquis avant et après ajout de 500 μL de solution de soude ayant piégé H_2S (Figure 67). Afin de mettre en place cette méthode, Le coefficient d'extinction molaire du diiode est déterminé (Annexe 6.2.) et vaut $\epsilon_{451\text{nm}} = 765 \pm 30 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Cette valeur est cohérente avec la littérature ($\epsilon_{460\text{nm}} = 728 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ [209] ; $\epsilon_{460\text{nm}} = 731 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ [210]).

Pour terminer, H_2S est déterminé par formation de bleu de méthylène en utilisant les solutions de DMPD et de $FeCl_3$ utilisées pendant la thèse lors de l'étude en solution de la réactivité de Na_2S (9mM de DMPD, 6mM de $FeCl_3$ et 2M HCl, voir §IV.5). Une droite d'étalonnage est préparée à partir de solution de Na_2S de différentes concentrations. Cette

méthode reprend celle proposée par l'INRS en améliorant les inconvénients déjà décrits. Ici, la concentration de la solution de Na₂S est choisie inférieure à la limite de solubilité et son pH est ajusté à 12 avec de la soude. Pour l'évaluation de la concentration en H₂S de la bouteille, le système décrit à la Figure 67 est utilisé. 1 mL de solution de NaOH ayant piégé H₂S est introduite dans une solution composée de 1 mL de DMPD et 1 mL de FeCl₃ à une acidité de 2 M HCl.

Les trois méthodes décrites sont utilisées à deux reprises pour calibrer la bouteille et pour chacune, l'essai est reproduit 3 fois afin de vérifier la répétabilité (Tableau 16).

Aucune mesure ne concorde. Pour une même expérience, les teneurs trouvées avec les méthodes utilisant le diiode sont cohérentes entre elles mais fausses. La teneur calculée est 35 fois plus élevée que la teneur attendue dans la bouteille (3 ppm). Cela est dû à la volatilité du diiode. ($H_{cc} = 1,3 \cdot 10^{-2}$). [104,206] En effet, le titrage indirect au thiosulfate et le dosage spectrophotométrique permettent tous deux de déterminer le diiode manquant dans solution mais aucune distinction ne peut être faite entre la volatilisation d'I₂ et la consommation de I₂ par réaction avec H₂S. En négligeant la perte d'I₂ par volatilisation, la teneur en H₂S se voit surestimée.

La formation de MB semble être une méthode satisfaisante. Les teneurs trouvées sont les plus basses obtenues, toutes méthodes confondues. Le résultat n'est pas reproductible entre l'essai 1 et l'essai 2. Cette différence peut être due à l'échantillonnage et non à la méthode.

	Essai 1 Temps de piégeage : 8 h 25 Débit d'H ₂ S : 19 mL/min V _{gaz} = 9,595 L V _{NaOH} = 10 mL	Essai 2 Temps de piégeage : 10 h Débit d'H ₂ S : 20 mL/min V _{gaz} = 12,16 L V _{NaOH} = 60 mL
Titration indirecte de I ₂ avec S ₂ O ₃ ²⁻ (à 1 mM)	80 ppm	413 ppm
Dosage au I ₂ par spectrophotométrie (suivi à 451 nm)	49-68 ppm	300 ppm
Formation de MB	5 ppm	8,4-9,6 ppm

Tableau 16 : teneurs en H₂S obtenues pour les différentes méthodes de calibration

VI.4.3. Exposition à H₂S en dynamique

Bien que les monolithes synthétisés pendant la thèse ne détectent pas H₂S en-dessous de 1000 ppm, 1 monolithe de formulation N°9 est exposé pendant 16 heures à un débit de 20 mL/minute d'H₂S à 2 ppm. Les spectres d'absorption du monolithe avant et après exposition se superposent totalement : il n'y pas eu de réaction (Figure 68).

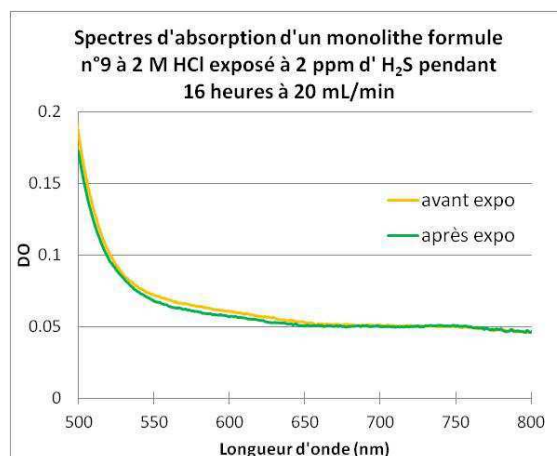


Figure 68 : Spectres de monolithes exposés en dynamique à 2 ppm d'H₂S.

Une exposition à 1000 ppm en statique revient à exposer les monolithes à environ 6,5 µmol d'H₂S. L'exposition à 2 ppm à 20mL/min pendant 16 heures équivaut à 1,7 µmol d'H₂S. Le monolithe est exposé à une concentration inférieure à la limite de détection.

L'exposition en banc gaz n'a pas été davantage développée car la teneur en H₂S de la bouteille de mélange gazeux est trop faible. En revanche, l'exposition des capteurs à H₂S ou MeSH émis par des bactéries a fait l'objet de l'étude décrite dans la section suivante.

VII. Tests biologiques

VII.1. Choix des souches

L'exposition de monolithe N°9 est réalisée en milieu biologique. Deux souches de bactéries ont été choisies. *Citrobacter freundii* (ATCC 8090) est une souche répertoriée H₂S-positif, ce qui a été confirmé par un test d'identification à l'aide d'une galerie API 20E. Cette souche est capable de synthétiser l'enzyme thiosulfate réductase qui réduit le thiosulfate de sodium en H₂S. La production d'H₂S y est détectée par précipitation d'un solide noir (Fe₂S) en présence d'ions ferreux (Fe²⁺). *Hafnia alvei* (ATCC 13337) est choisie comme souche H₂S-négative. Lors d'un test d'identification sur galerie API 20E, elle ne forme pas de précipité noir en présence de thiosulfate de sodium. Cette souche est considérée comme le témoin négatif.

VII.2. Description du montage d'exposition

Les monolithes de formulation N°9 sont exposés à des bactéries cultivées sur gélose en boîtes de Petri. Le milieu gélosé est composé de LB (*Lysogeny Broth* contenant 10 g/L de tryptone, 5 g/L d'extrait de levure, 5 g/L de NaCl), d'agar (15 g/L) et est enrichi en thiosulfate de sodium (1 g/L). Les boîtes sont préparées au laboratoire afin d'inclure un cristalliseur au milieu de la boîte de Petri (Figure 69).

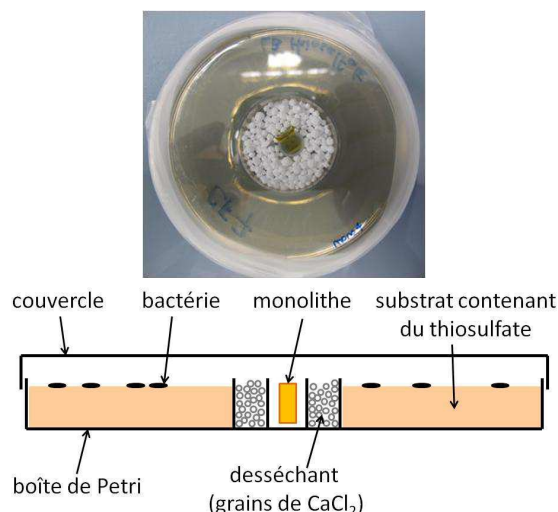


Figure 69 : Schéma et photo du montage d'exposition d'un capteur à une culture de bactéries

Le milieu gélosé est coulé autour de ce cristallisateur destiné à contenir le monolithe et du chlorure de calcium. Bien que le milieu gélosé génère moins d'humidité qu'une culture en liquide, l'introduction de desséchant reste nécessaire pour protéger le monolithe d'un excès d'humidité (la présence d'eau entraîne l'hydrolyse de la QD en Qm_a qui peut se condenser avec une molécule de DMPD pour former du Bindschedler's green : dégradation de la molécule sonde).

Une pré-culture de chaque souche est réalisée en liquide dans du LB. A $t = 0$, la gélose est inoculée avec 10^7 cfu, le monolithe est placé au centre du cristallisateur avec le chlorure de calcium. Les boîtes sont incubées une nuit à l'étuve à 37°C .

VII.3. Exposition des capteurs

Chaque souche est exposée en condition aérobie et anaérobie. En condition anaérobie, les souches H_2S -positives remplacent l'oxygène par les sulfates, accepteurs d'électrons dans le processus de respiration cellulaire (cf §1.1). On s'attend donc à ce que *Citrobacter freundii* produise davantage d' H_2S et de formes réduites du soufre (MeSH , Me_2S) en condition anaérobie.

Pour les conditions anaérobies, les boîtes de gélose sont inoculées en boîte à gants, sous atmosphère d'argon. Pour les conditions aérobies, les boîtes sont inoculées à l'air. Dans les deux cas, les boîtes de culture sont parafilmées pour que les gaz émis par la culture ne s'en échappent pas. L'air ne sera alors pas renouvelé pour les boîtes en condition aérobie ce qui entraînera un épuisement de la quantité d'oxygène et rendra l'atmosphère anaérobie en fin d'expérience.

Après une nuit d'incubation à 37°C , le spectre des monolithes de formulation N°9 est acquis (Figure 70). Comme attendu, *Hafnia alvei* ne produit pas d' H_2S . Les monolithes ne réagissent pas et la dégradation de la molécule sonde due à l'humidité est observée vers 710 nm aussi bien en condition aérobie qu'anaérobie. Les monolithes exposés à des cultures de *Citrobacter freundii* ne présentent pas de pics caractéristiques du bleu de méthylène. Si *Citrobacter freundii* a émis du H_2S , la quantité est inférieure à la limite de détection et il n'a

pas été détecté par le monolithe. En revanche, un pic distinct est observé vers 560nm dans les deux conditions aérobie et anaérobie. Ce pic correspond au produit P2 formé en présence de méthanthiol. Il est intéressant de remarquer que le pic d'absorption est plus intense en condition anaérobie qu'en condition aérobie. On a donc formé plus de MeSH en condition anaérobie, ce qui est en accord avec ce que nous attendions.

Citrobacter freundii est effectivement capable d'émettre du méthanthiol. Ce gaz a d'ailleurs été relevé comme un interférent éventuel de la détection d'H₂S. En effet, l'exposition simultanée à du méthanthiol et du sulfure d'hydrogène au paragraphe VI.3. a montré que le méthanthiol était préférentiellement détecté.

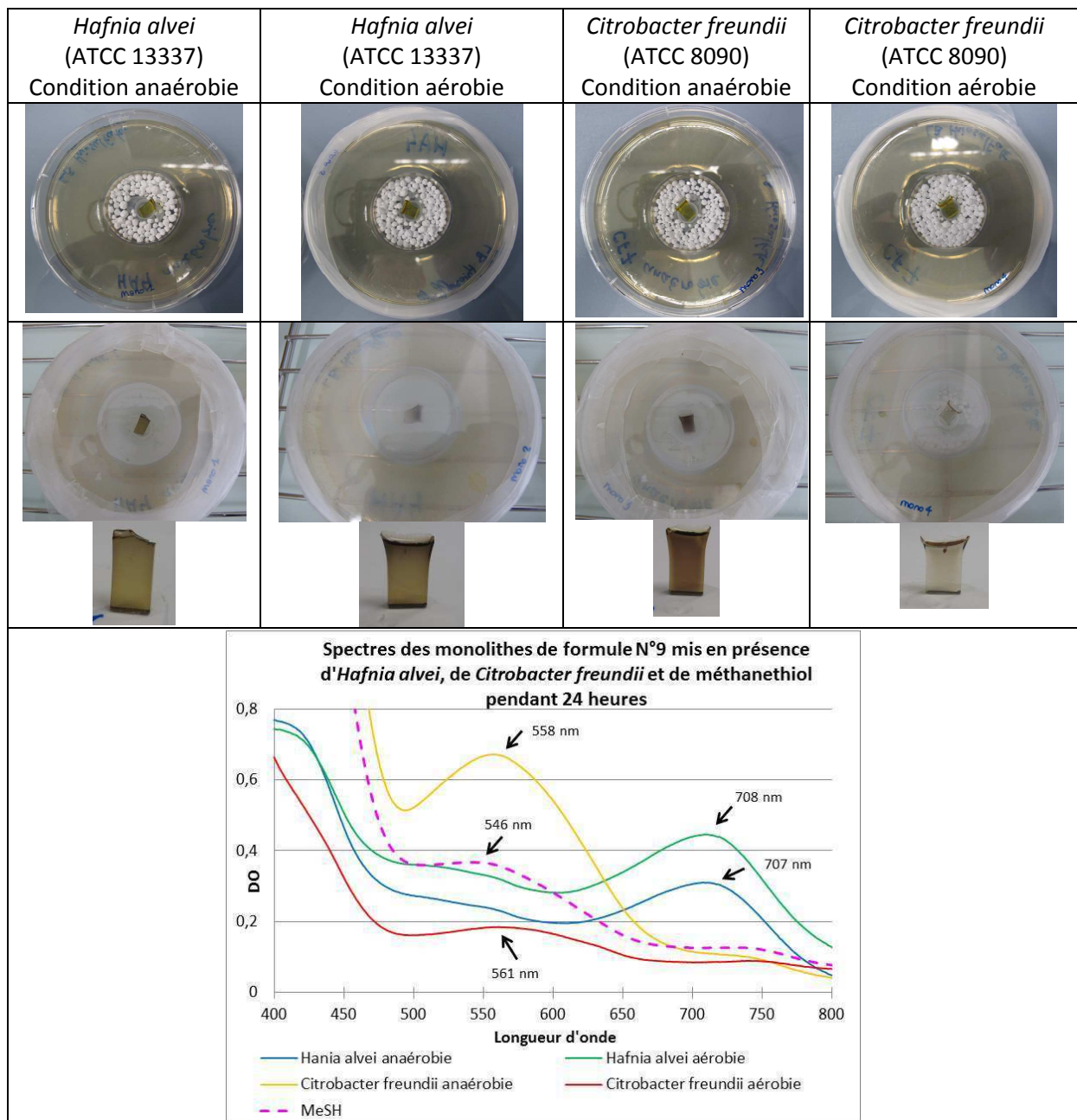


Figure 70 : Photos et spectres des monolithes N°9 exposés à des cultures de *Citrobacter freundii* (H₂S-positive) et de *Hafnia alvei* (H₂S-négative)

Le monolithe N°9 est, nous l'avons montré, sensible à l'humidité qui entraîne la formation d'un sous-produit. Pour la détection de méthane-thiol produit par *Citrobacter freundii*, ce sous-produit n'est pas considéré comme un interférent puisque sa bande d'absorption ($\lambda \approx 710$ nm) est différente de celle du produit de la réaction entre QD et MeSH ($\lambda \approx 560$ nm). Le monolithe de formulation N°9 peut donc être utilisé en milieu biologique pour la détection de méthane-thiol, sans interférence avec l'humidité.

VIII. Conclusion

Ce chapitre propose l'élaboration d'un capteur colorimétrique de sulfures capable de distinguer le sulfure d'hydrogène (H_2S) du méthane-thiol (MeSH). Ces deux composés sont des métabolites volatils produits par plusieurs bactéries (*Escherichia coli*, *Salmonella*, *Citrobacter*, ...). Leur détection sélective permet donc de mettre en évidence la présence de ces bactéries dans un milieu de culture et de les discriminer. Le capteur est une matrice poreuse de polymère inorganique dopée de molécules sondes capables de réagir sélectivement avec les mCOV cibles.

La molécule sonde retenue est la N,N-diméthyl-p-phénylènediamine (DMPD) oxydée par les ions Fe^{3+} . Elle permet la détection simultanée de H_2S et de MeSH par formation de composés de coloration bien distincte, respectivement le bleu de méthylène (bleu, $\lambda_{abs} = 668$ et 750 nm) et la 2-méthylthio-4-N,N-diméthyl-phénylènediamine (rouge-rose, $\lambda_{abs} = 500$ nm).

Avant d'incorporer les réactifs, DMPD et Fe^{3+} , dans une matrice poreuse, il est nécessaire d'étudier leur stabilité au cours du temps et de trouver les conditions optimales de réactivité vis-à-vis d' H_2S et de MeSH. En effet, le capteur doit être stable pendant la durée de stockage (6 mois) et être fiable et rapide lors des mesures. Des études en solution ont donc été entreprises dans ce but mais également pour élucider la nature des intermédiaires de réaction et des sous-produits, qui reste soumise à des controverses. A cet effet, nous avons balayé une très large gamme de pH, avec des solutions aqueuses très acides ($[HCl] < 0,1$ M) et nous avons utilisé diverses techniques telles que la spectrophotométrie, la spectroélectrochimie et la résonance paramagnétique électronique. Ces études nous ont permis de délimiter les zones de formation des espèces mises en jeu au cours de l'oxydation de DMPD. Ainsi, le Wurster's red (WR) ($\lambda_{abs} = 319, 515$ et 550 nm), radical cation formé par oxydation monoélectronique de la DMPD, est instable pour des acidités supérieures à 0,1 M HCl et subit rapidement une deuxième oxydation à un électron pour former la quinonediimine (QD) ($\lambda_{abs} = 285$ nm). QD, principal intermédiaire réactionnel impliqué dans la détection des sulfures, peut s'hydrolyser pour former Qm_a ($\lambda_{abs} = 220$ et 277 nm) dont le spectre d'absorption a été mis en évidence pour la première fois. Cette espèce est elle-même instable et donne lieu successivement à la formation de DMAP ($\lambda_{abs} = 220$ et 272 nm), puis à une espèce finale stable absorbant à 246 nm.

Un autre résultat particulièrement important est la mise en évidence d'une zone d'acidité élevée (HCl = 2M) propice à la stabilisation de QD. Dans ces conditions, QD est préservée de l'hydrolyse et permet l'obtention de bons rendements de formation de bleu de

méthylène en présence de H₂S. Cette condition optimale de stabilisation de la molécule sonde a été transposée par la suite pour la synthèse de capteurs par voie sol-gel.

La réaction de QD avec H₂S entraîne la formation de MB, composé bleu fortement absorbant ($\lambda_{\text{abs}} = 668$ et 750 nm). Lorsqu'elle est en présence de MeSH, QD réagit pour former la 2-méthylthio-4-N,N-diméthyl-phénylènediamine, composé rouge ($\lambda_{\text{abs}} = 500$ nm), dont la structure suggérée dans la littérature correspondrait à la DMPD substituée en ortho de la fonction amine par une fonction thiométhyl (DMPD-S-Me). Un excès de MeSH conduit à la formation d'un second produit de couleur marron, absorbant à 422 et 560 nm dont la structure n'a pas été élucidée. La formation de ce composé n'a, à ce jour, pas été reportée.

La synthèse des capteurs de H₂S et MeSH est réalisée par voie sol-gel. Les précurseurs ont été choisis pour obtenir des matériaux microporeux dont les diamètres de pore varient entre 8 et 28 Å. Cette distribution de tailles de pores est bien adaptée à celle des analytes à détecter et permet de s'affranchir des molécules volatiles de plus grande taille. Cependant, dans les conditions de dopage des monolithes ([DMPD] = 50 mM ; [FeCl₃] = 25 mM ; [HCl] = 2 M HCl), le nombre de pores « efficaces » pour la détection de H₂S, soit pouvant contenir au minimum 2 molécules de DMPD, est très faible, de $2,8\%$. La proportion de pores vides serait, selon nos estimations, de 83% , et celle des pores contenant au moins une molécule est de $17,3\%$. Ce résultat est en accord avec les observations expérimentales montrant une meilleure détection de MeSH par rapport à H₂S.

Pour les raisons que nous venons d'évoquer, la sensibilité des capteurs est faible, de 1000 ppm pour H₂S et MeSH. Cependant, il est à noter que la limite de détection pour MeSH n'a pas encore été déterminée, car dans les différentes conditions d'exposition, le produit formé absorbant à 560 nm est celui obtenu en présence d'un excès de MeSH. Ces résultats sont reproduits en milieu biologique, lorsque le capteur est exposé à une culture de *Citrobacter freundii*, bactérie capable d'émettre, entre autres, H₂S et MeSH.

L'eau reste un interférant sérieux pour la détection de H₂S, notamment lorsque le capteur est exposé à des cultures de bactéries. L'humidité entraîne la dégradation de la sonde et l'apparition d'une bande d'absorption centrée à 715 nm, attribuée au vert de Bindschedler. En revanche, l'humidité ne semble pas affecter la détection de MeSH, tout du moins pour les fortes concentrations qui ont été utilisées.

Pour conclure ce chapitre, nous proposons quelques pistes pour améliorer ces capteurs. La première serait d'augmenter le nombre de pores « efficaces » pour le dopage et la capture des analytes. Ainsi, l'utilisation de précurseurs permettant d'agrandir la taille des pores et de les rendre plus hydrophobes serait un premier pas. Par ailleurs, dans l'objectif de stabiliser la molécule sonde, une synthèse de capteurs très acides (6 M HCl par exemple) permettrait d'empêcher l'oxydation de la DMPD par les ions Fe³⁺ pendant les phases de séchage et de stockage du capteur. Le capteur pourrait être ré-activé à l'emploi, par l'abaissement de l'acidité intrapore en présence de l'humidité générée par les cultures de bactéries. Une autre possibilité pour améliorer le temps de diffusion des analytes dans le réseau poreux vers les pores « efficaces » serait de remplacer les monolithes par des films minces poreux, notamment pour le détecteur de H₂S.

Chapitre 3 : Détection des amines biogènes

I. Introduction	107
<i>I.1. Source d'amines biogènes</i>	107
<i>I.2. Activités des amines biogènes en faibles concentrations</i>	108
<i>I.3. Dangers des amines biogènes à fortes concentrations</i>	108
<i>I.4. Sources d'amines biogènes dans l'alimentation</i>	109
<i>I.5. Tests réalisés pour le contrôle qualité</i>	110
II. Techniques de détection des amines biogènes	111
<i>II.1. HPLC</i>	111
<i>II.2. Utilisation d'enzyme</i>	114
<i>II.3. Méthode spectrophotométrique</i>	115
II.3.1. Mesure de fluorescence.....	115
II.3.2. Mesure d'absorption.....	117
<i>II.4. Choix de la molécule sonde</i>	119
III. Etude en solution	121
<i>III.1. Synthèse et caractérisation de la molécule sonde Naphthol AS-BI déméthylé</i>	121
<i>III.2. Etude en absorption</i>	121
III.2.1. Etude de l'interaction dans l'acétonitrile et l'éthanol	121
III.2.2. Détermination de la stœchiométrie du complexe : Méthode de Job	123
<i>III.3. Etude en spectrophotométrie de fluorescence</i>	125
III.3.1. Etude des propriétés des états excités de Ar-OH et du complexe Ar-OH/Amine dans l'acétonitrile et l'éthanol	125
III.3.2. Calcul du rendement quantique de fluorescence des différentes espèces mises en jeu.....	127
IV. Synthèse de monolithes	130
V. Conclusion	132

I. Introduction

I.1. Source d'amines biogènes

Les amines biogènes sont des composés azotés de faible poids moléculaire possédant au moins une fonction amine primaire. Elles sont générées dans les tissus chez l'homme, des animaux et des plantes mais peuvent aussi être contenues dans divers aliments contenant des protéines. [211,212] Les amines biogènes comme l'histamine, la tyramine, la tryptamine, la putrescine et la cadavérine sont les produits de la décarboxylation enzymatique des acides aminés histidine, tyrosine, tryptophane, ornithine et lysine, respectivement. La spermine est une polyamine issue de la spermidine, elle-même issue de la putrescine (Figure 71). [213]

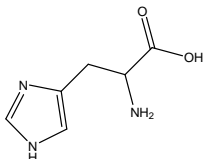
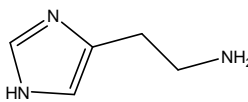
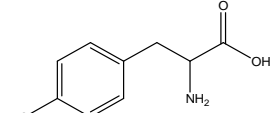
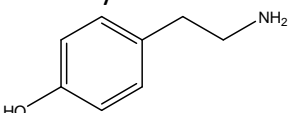
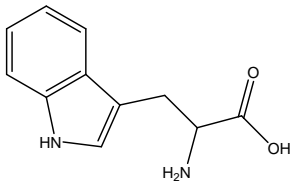
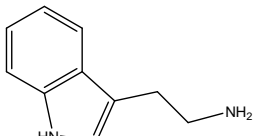
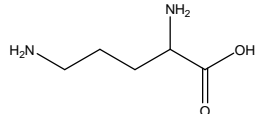
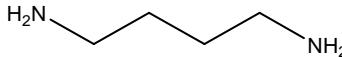
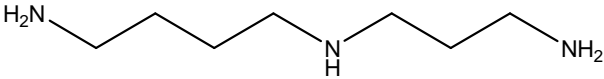
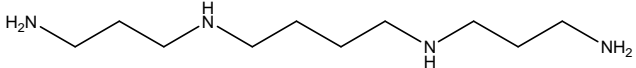
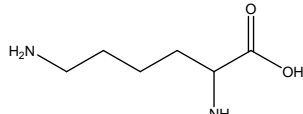
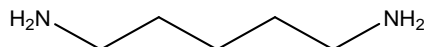
Acides aminés	Amines biogènes correspondantes
<p>Histidine</p> 	<p>Histamine</p> 
<p>Tyrosine</p> 	<p>Tyramine</p> 
<p>Tryptophane</p> 	<p>Tryptamine</p> 
<p>Ornithine</p> 	<p>Putrescine</p>  <p>Spermidine</p>  <p>Spermine</p> 
<p>Lysine</p> 	<p>Cadavérine</p> 

Figure 71 : Structures des amines biogènes les plus étudiées et des acides aminés dont elles sont issues.

1.2. Activités des amines biogènes en faibles concentrations

Les amines biogènes possèdent d'importantes fonctions physiologiques mais peuvent, à fortes doses, avoir des effets nuisibles pour la santé. Pendant la biosynthèse de polyamines, les amines biogènes sont formées par des enzymes décarboxylases endogènes naturellement présentes dans la nourriture. [213] Par exemple, spermine, spermidine et cadavérine sont impliquées dans la régulation de la croissance et la prolifération de cellules. [214] Certaines polyamines exogènes sont même utilisées comme agents de conservation des fruits et des légumes. [215] La dopamine et la sérotonine agissent comme des neurotransmetteurs et l'histamine et la tyramine interviennent dans le processus d'inflammation.

Certaines amines aromatiques (tyramine, tryptamine et β -phényléthylamine) ont des propriétés vasoconstrictives alors que d'autres (histamine et sérotonine) ont un effet vasodilatateur. [216] L'histamine régule une grande variété de fonctions car elle peut établir des interactions sur quatre types de récepteurs membranaires présents dans les tissus respiratoires, gastro-intestinaux, cardiovasculaires, hématologiques et immunologiques ainsi que dans la peau. [217] Il a été montré que les diamines (cadavérine et putrescine) et les polyamines (spermine et spermidine) favorisent l'absorption intestinale. [216] Bien que la putrescine et la cadavérine ne présentent pas de risque direct, elles peuvent jouer un rôle important dans l'intoxication alimentaire car elles augmentent la toxicité de la tyramine et de l'histamine.

1.3. Dangers des amines biogènes à fortes concentrations

Les amines biogènes peuvent être d'origine endogène et sont présentes à de faibles concentrations dans des aliments non fermentés comme les fruits, les légumes, la viande, le lait et le poisson. En revanche, de hautes concentrations de ces amines sont issues d'une activité microbienne dans des matrices alimentaires lors de la production ou du stockage de denrées comme le vin, la viande fermentée, le poisson et les produits de la mer, le fromage, les légumes fermentés, le chocolat, la choucroute et la bière. [218,219]

Chez l'homme sain, les amines biogènes exogènes absorbées au travers de l'alimentation sont rapidement dégradées par oxydation en acide carboxylique, sous l'action d'enzymes oxydases. Les enzymes monoamino oxydase (MAO, EC 1.4.3.4¹) et diamino oxydase (DAO, EC 1.4.3.6) jouent un rôle important dans le procédé de détoxification. [220] Cependant, si de fortes quantités d'amines biogènes sont absorbées via l'alimentation, le système de détoxification n'est pas en mesure d'éliminer suffisamment ces amines. Ainsi, la consommation de grandes quantités de ces composés entraînent des effets indésirables comme les maux de tête, les nausées, l'hypo- ou l'hypertension, des palpitations cardiaques,

¹ Cette numérotation correspond au numéro d'identification BRENDA (<http://www.brenda-enzymes.info/>). BRENDA est une base de données gratuite répertoriant diverses informations sur les enzymes issues de la littérature.

des hémorragies intracérébrales et des chocs anaphylactiques. [221] Ces effets sont d'autant plus forts que les patients sont traités avec des inhibiteurs de monoamine oxydase, ou qu'ils présentent une déficience (génétique ou acquise) en diaminoxydase. En effet, le processus de détoxification est perturbé et de fortes quantités d'amines biogènes peuvent s'accumuler dans le corps. Les amines biogènes sont des facteurs antinutritionnels, c'est-à-dire que ce sont des substances naturellement présentes dans les aliments qui peuvent potentiellement affecter la santé et la croissance en empêchant l'absorption des nutriments. [216]

1.4. Sources d'amines biogènes dans l'alimentation

Les principales amines biogènes associées au vin sont la putrescine, l'histamine, la tyramine et la cadavérine, suivies de la phényléthylamine, la spermidine, la spermine, l'agmatine et la tryptamine. [222] Leur teneur totale dépend de la qualité du vin (procédé de vinification, conditions et temps de stockage, qualité des raisins) et peut atteindre 50 mg/L. La putrescine, en plus de ses effets toxiques, dégrade le goût du vin. [223]

Les amines biogènes rencontrées dans les fruits de mer avariés sont l'histamine, la tyramine, la putrescine et la cadavérine. [217] Ces mêmes amines sont retrouvées dans le fromage mais leur quantité dépend de la flore microbienne, de la fermentation et de la pasteurisation du lait. Les amines biogènes sont stables thermiquement et résistent donc bien à la chaleur. On les retrouve dans les plats chauffés comme la fondue et la raclette. [224]

Les amines biogènes sont issues de la décarboxylation d'acides aminés sous l'action d'enzymes décarboxylases produites par des micro-organismes (Figure 72). Bien que les enzymes décarboxylases ne soient pas répandues parmi les bactéries, certaines espèces appartenant aux genres *Bacillus*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Shigella*, *Lactobacillus*, *Salmonella* et *Streptococcus* sont capables de décarboxyler un ou plusieurs acides aminés. [213,225]

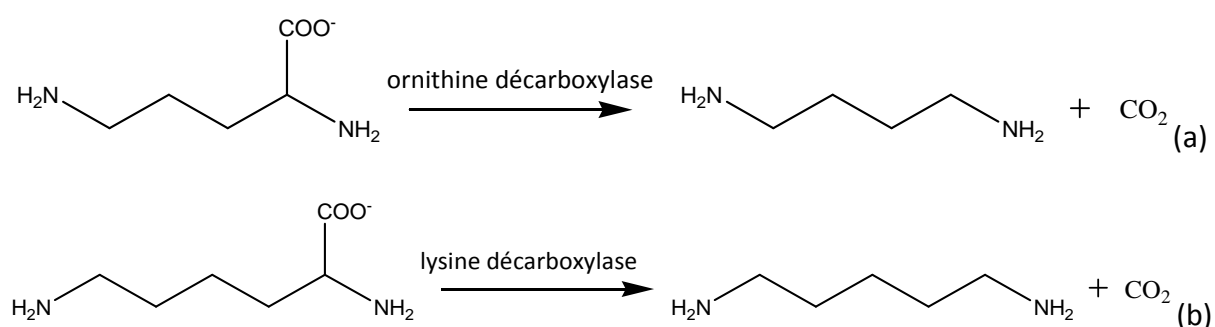


Figure 72 : Production d'amines biogènes telles que (a) la putrescine et (b) la cadavérine par décarboxylation des acides aminés correspondants (l'ornithine et la lysine, respectivement).

Certaines espèces comme *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* et *Clostridium botulinum* sont pathogènes. La salmonellose est une toxi-infection causée par des espèces de bactéries appartenant au genre *Salmonella*. L'infection par des salmonelles est surtout

d'origine alimentaire (viande, charcuterie, volailles, œufs) et les symptômes se manifestent sous deux aspects essentiels : les fièvres typhoïdes et paratyphoïdes et les gastro-entérites. [226] Dans les cellules procaryotes, le rôle physiologique de la synthèse d'amines biogènes semble lié aux mécanismes de défense utilisés par les bactéries pour résister aux environnements acides. [222] Pour la conservation des aliments, il est intéressant de savoir que des conditions anaérobies ont un effet significatif sur la biosynthèse d'amines biogènes. Par exemple, *Enterobacter cloacae* produit moitié moins de putrescine en condition anaérobie. [220]

1.5. Tests réalisés pour le contrôle qualité

Pour toutes ces raisons, il est important de suivre les quantités d'amines biogènes dans la nourriture. La concentration en amines biogènes peut être considérée comme un marqueur de la contamination microbienne. Détecter l'histamine, la cadavérine ou la putrescine permettrait donc de remonter à une présence bactérienne. La surveillance des teneurs en putrescine, spermidine et spermine, responsables d'intoxication alimentaire, peut aussi être utilisée comme indice de fraîcheur. Parmi les aliments où l'on trouve des amines biogènes, une attention toute particulière a été donnée au fromage. Des facteurs extrinsèques comme le pH, la quantité de sel et d'humidité, la température d'affinage jouent un rôle important. [218] L'intérêt pour ces amines est grandissant car leur détection permet non seulement de déceler une toxicité potentielle, mais aussi d'évaluer la qualité de l'affinage. En alimentation, la présence d'amines biogènes a deux impacts : un impact sanitaire pour les intoxications et la détection de bactéries ; et un impact économique pour le contrôle qualité des produits.

Récemment, l'utilisation des amines biogènes comme marqueurs du cancer a été étudiée suite à la concentration élevée en polyamines observée chez des patients atteints de cancers. [227] La détection des amines biogènes pourrait alors servir à la détection précoce de maladies. Deux applications principales motivent la détermination des amines biogènes : leur toxicité et la possibilité de les utiliser comme indicateurs de contrôle qualité en industrie agro-alimentaire ; la détection précoce de maladie en les utilisant comme marqueurs de cancer ou comme empreinte olfactive de bactéries. Dans les deux cas, la complexité de l'échantillon (alimentaire ou humain) et la faible teneur des composés à détecter représentent un obstacle majeur. La plupart des méthodes analytiques sont complexes et exigent une instrumentation coûteuse et du personnel qualifié. Ainsi, il existe un réel besoin d'un moyen rapide et facile de détection de ces composés.

On s'intéresse particulièrement à la détection de la cadavérine qui est produite entre autres par *E. coli*, *H. alvei*, *L. monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* [213] et *Salmonella*.

II. Techniques de détection des amines biogènes

Plusieurs méthodes ont été mises au point pour la détermination d'amines biogènes en matrices alimentaires. [228] Des techniques de chromatographie comme la chromatographie en couche mince, [229] la chromatographie liquide à haute pression [230,231,232,233] couplée ou non à la spectrométrie de masse, [234,235] l'électrophorèse capillaire, [236,237,238,239] ont été développées ainsi que des méthodes enzymatiques et immuno-enzymatiques. [240,241,242] La détection directe d'amines biogènes par des méthodes optiques comme la fluorescence ou la spectroscopie UV ont été explorées. [243,244,245]

Cependant, les amines biogènes absorbent très peu dans le visible et des techniques de dérivation chimique sont nécessaires. [218,220,246,247,248] Les détecteurs colorimétriques basés sur des complexes de métal de transition, [249,250] des hydrogels, [251,252] des barrettes de capteurs (sensors arrays) [253,254] et le couplage réversible ou irréversible avec des molécules organiques [255,256,257] semblent plus appropriés pour une lecture directe du résultat. Des supports aussi divers que des électrodes, [258] des matrices hydrogels, des polymères à empreinte moléculaire (Molecular Imprinted Polymer ou MIP) [259] ou des matrices inorganiques solides « sol-gel », sont prometteurs pour l'élaboration de capteurs portables et faciles d'utilisation.

II.1. HPLC

Les amines n'absorbant pratiquement pas dans l'UV-visible et n'étant pas fluorescentes, des méthodes de couplage appelées dérivation chimique sont utilisées pour améliorer leur détection. Différents réactifs comme le chlorure de dansyl, [216] le chlorure de dabsyl, [216] l'*o*-phthaldéhyde, la fluorescéine isothiocyanate [218] sont utilisés pour former avec les amines (Figure 73 et Figure 74) des dérivés colorés plus ou moins stables. La réaction de dérivation chimique est réalisée à entre 40°C et 70°C pendant 20 minutes à une heure, selon les protocoles. Un suivi colorimétrique à 254 nm (dansyl) et 446 nm (dabsyl) ou en fluorescence ($\lambda_{\text{ex}} \sim 320\text{-}350 \text{ nm}$ / $\lambda_{\text{ém}} \sim 520 \text{ nm}$) est réalisé. [218] L'*o*-phthaldéhyde (OPA) ne réagit qu'avec des amines primaires pour former des dérivés instables qui doivent être détectés dans les 5 heures suivant la dérivation chimique. L'inconvénient de la fluorescéine isothiocyanate est qu'elle doit être stockée à -10°C sous azote.

Bien que la dérivation chimique ajoute une étape à l'analyse, ce qui entraîne une perte de temps et un risque de réaction incomplète, elle reste très utilisée, notamment couplée à la chromatographie en phase liquide (CPL).

L'analyse en chromatographie en phase liquide permet de séparer les différents composés chimiques contenus dans l'échantillon via une colonne chromatographique. Pour identifier ces composés, un détecteur est placé en sortie de colonne. L'inconvénient majeur de la matrice alimentaire est qu'elle nécessite une préparation de l'échantillon. Les

échantillons alimentaires sont extraits avec des solvants et de l'acide chlorhydrique puis centrifugés. Le surnageant est analysé. [216]

Il existe plusieurs types de détecteur adaptés aux amines biogènes :

- ✓ Les détecteurs pour les mesures d'absorption et de fluorescence sont utilisés pour la détection d'amines impliquées dans une dérivation chimique (type OPA ou chlorure de dansyl).
- ✓ Le détecteur à diffusion de lumière après évaporation (ELSD) [218] mesure la quantité de lumière diffusée par les particules de composés créées lors de l'évaporation du solvant contenu dans l'aérosol formé en sortie de colonne. Lorsque le solvant s'évapore, les molécules thermosensibles se décomposent et les amines biogènes (thermostables) ne s'évaporent pas. Elles s'agrègent en particules qui seront détectées par l'ELSD. L'avantage de cette méthode de détection est la possibilité de quantifier des composés non volatils ne présentant pas d'absorption détectable au-dessus de 200 nm.

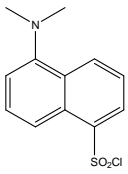
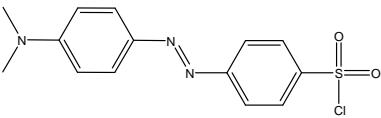
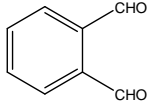
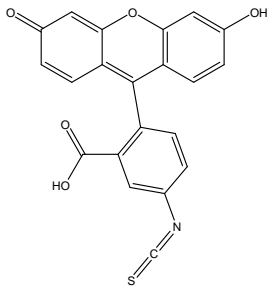
<p style="text-align: center;">Chlorure de dansyl (1-diméthyl-amino-naphtalène-5-sulfonyl chlorure)</p> 	<p style="text-align: center;">Chlorure de dabsyl (4-(4-diméthyl-amino-phenylazo)-benzène-sulfonyl chlorure)</p> 
<p style="text-align: center;">o-phthaldéhyde (OPA)</p> 	<p style="text-align: center;">Fluorescéine isothiocyanate</p> 

Figure 73 : Structures des réactifs de dérivation chimique les plus utilisés.

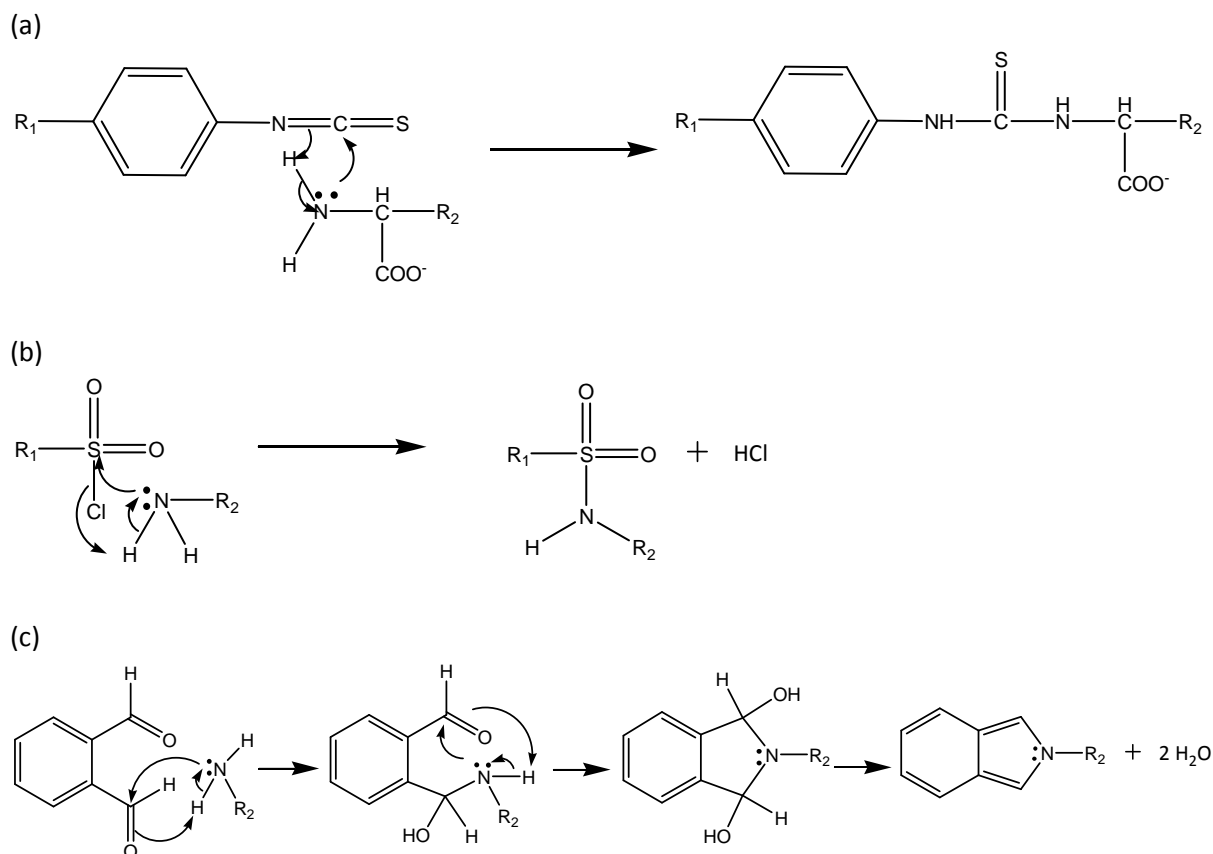


Figure 74 : Mécanismes réactionnels impliqués dans la détection par dérivation chimique utilisant (a) un dérivé isothiocyanate ; (b) le chlorure de dansyl ou de dabsyl ; (c) le phtaldéhyde.

D'autres méthodes analytiques utilisent la détection conductimétrique ou ampérométrique. Par exemple, J. T. English *et al.* ont déposé électrochimiquement des films de poly(aniline acide boronique) sur des électrodes en or interdigitées (Figure 75). L'interaction entre la butylamine présente dans la phase gaz et le film se traduit par une modification de la résistance des films. Ces détecteurs permettent de déterminer des concentrations de 10 ppb de butylamine. [260] En revanche, l'influence de la présence d'interférents n'a pas été étudiée.

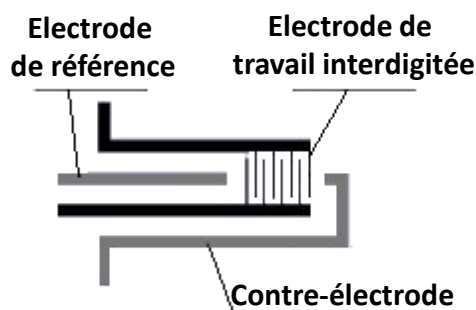


Figure 75 : Schéma de principe d'un système électrochimique à électrodes interdigitées. [261]

II.2. Utilisation d'enzyme

L'histamine déshydrogénase (HDH) présente chez *Rhizobium sp.* permet la déamination de l'histamine en imidazole acétaldéhyde. Cette réaction produit un électron qui est transféré au sel de 2-(2-méthoxy-4-nitrophényl)-3-(4-nitrophényl)-5-(2,4-disulfophényl)-2H-tétrazolium (WST-8) grâce au 1-méthoxy-5-méthylphénaziniumméthylsulfate (1-méthoxy-PMS) dont le rôle est d'assurer le transfert d'électron (Figure 76). Le formazan ainsi formé absorbe à $\lambda = 460 \text{ nm}$. Cette détection en phase liquide se déroule en 5 minutes à 37°C et dans une gamme de pH de 9-11,5. Elle permet de détecter jusqu'à $96 \mu\text{M}$ d'histamine. L'avantage de cette méthode réside dans la sélectivité de l'enzyme pour l'histamine qui exclut la détection de la putrescine et de la cadavérine. [262]

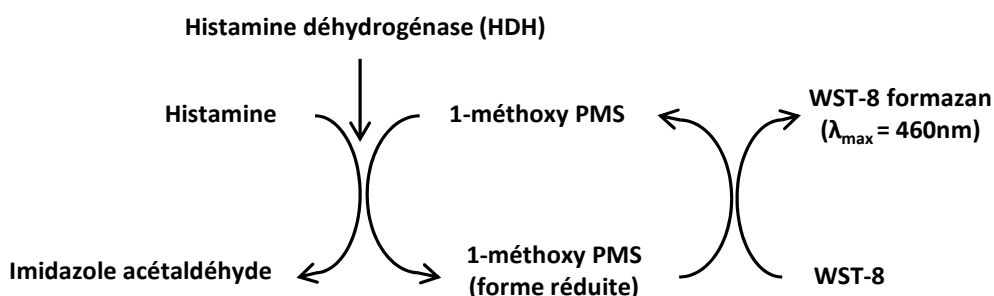
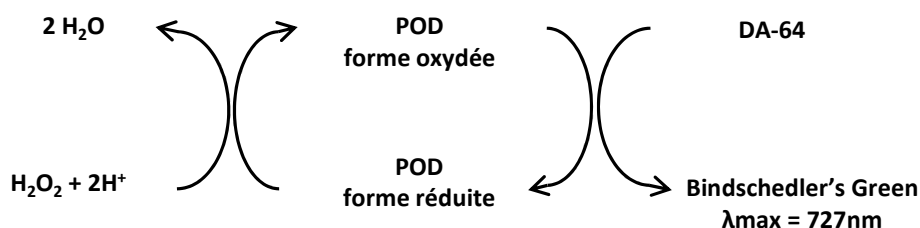


Figure 76 : Principe de détection utilisant l'enzyme histamine déshydrogénase (HDH). [262]

La polyamine oxydase extraite à partir de semis d'avoine (OSPO) catalyse la dégradation de la spermine et de la spermidine en pyrroline, diaminopropane et en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Une réaction d'oxydo-réduction entre H_2O_2 et la peroxydase POD va permettre de réduire le sel de N-(carboxyméthylaminocarbonyl)-4,4V-bis(diméthylamino)-diphénylamine (DA-64) en chlorure de N-[4-[[4-(diméthylamino)phényl]imino]-2,5-cyclohexadièn-1-ylidène]-N-méthylméthanaminium plus connu sous le nom de vert de Bindschedler (Figure 77). [203] Ce chromophore absorbe à $\lambda = 727 \text{ nm}$ et un suivi spectrophotométrique permet une détection dès 15 minutes de concentrations situées entre $0,2 \mu\text{M}$ et $10 \mu\text{M}$. La méthode est sélective et exclut la détection de la putrescine et de la cadavérine.



(a)

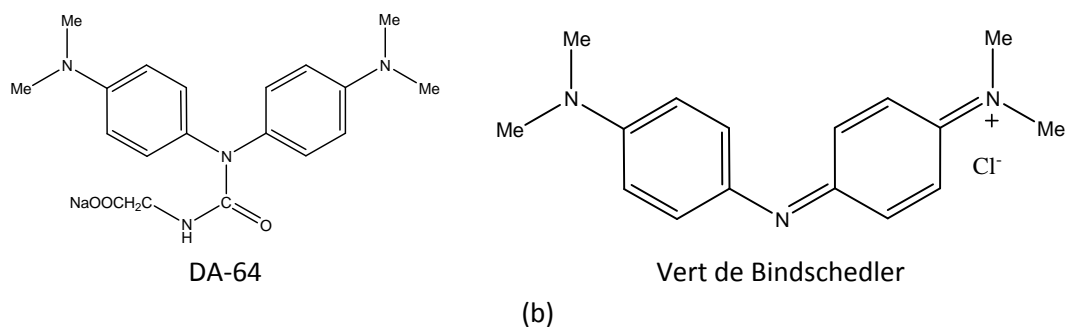


Figure 77 : (a) Principe de la détection du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) formé lors de la dégradation de la spermine et de la spermidine par la polyamine oxydase. [203] (b) Structure du chromophore sous forme oxydée (DA-64) et réduite (vert de Bindschedler).

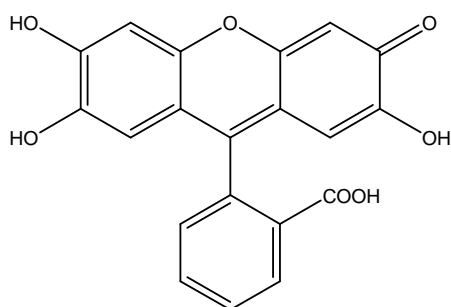
Un autre biocapteur électrochimique utilise le peroxyde d'hydrogène formé lors de l'action de la diamine oxydase (DAO) sur des amines biogènes. En effet, un courant est généré lorsque le Bleu de Prusse recouvrant l'électrode est réduit par le peroxyde d'hydrogène. Ce biocapteur n'est pas sélectif et permet la détection en solution de la putrescine, la cadavérine et l'histamine avec une limite de détection de 20 μM . [242]

II.3. Méthode spectrophotométrique

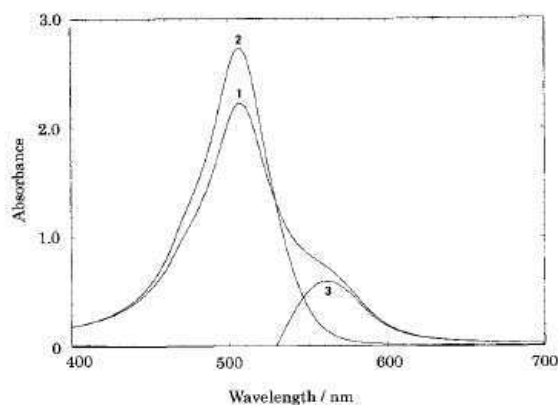
Le mode optique de détection couplé à des réactions colorimétriques permet à la fois une approche qualitative par l'appréciation de la couleur à l'œil nu et une approche quantitative par étude approfondie du spectre d'absorption ou de fluorescence. Dans cette approche pour détecter les amines biogènes, on trouve la formation de complexes métalliques, l'agrégation de polymères, la réaction avec des composés cycliques.

II.3.1. Mesure de fluorescence

La spermine (Spm) forme un complexe avec l'o-hydroxyquinonephtaléine (QP, Figure 78(a)) et le manganèse (II) de stœchiométrie Spm : QP : Mn(II) 2 : 2 : 1 en présence d'un surfactant non-ionique, le Tween 40. [263] Le complexe absorbe à 555 nm et présente un fort coefficient d'extinction molaire ($\epsilon = 1,4 \cdot 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) qui permet d'atteindre une limite de détection de 2-20 ng/mL (Figure 78(b)). La spermidine interfère très peu et la cadavérine et la putrescine n'interfèrent pas du tout.



(a)

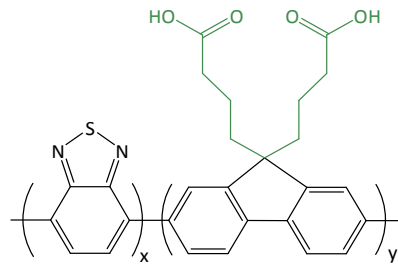


(b)

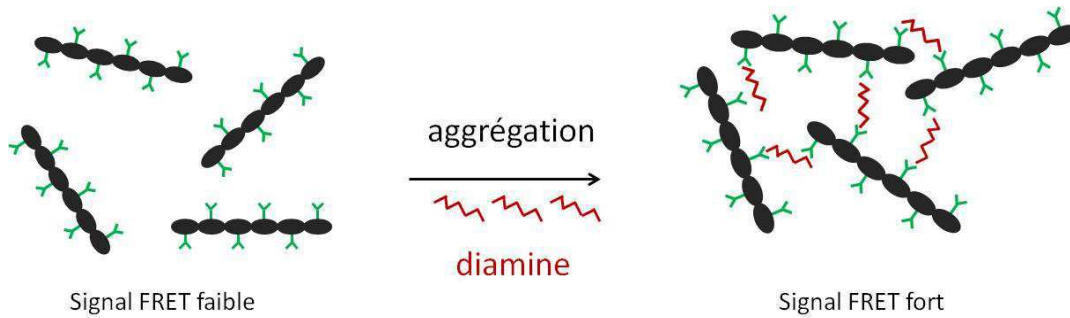
Figure 78 : (a) Structure de l'o-hydroxyquinonephthaléine (QP) ; (b) Spectres d'absorption du Tween 40 dans l'eau (1), du complexe Spm : QP : Mn(II) (2) et spectre différentiel (2-1) (3). [263]

La détection en fluorescence est souvent recherchée car elle est très sensible et permet d'obtenir des limites de détection plus basses qu'avec la spectrophotométrie d'absorption. La détection par FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) repose sur le transfert d'énergie entre deux molécules fluorescentes : un donneur et un accepteur. Le donneur est excité à une longueur d'onde déterminée. L'énergie d'excitation est transférée à l'accepteur avec un rendement de transfert dépendant de plusieurs paramètres tels qu'un bon rendement quantique de fluorescence du donneur, un coefficient d'extinction molaire important de l'accepteur et un recouvrement spectral optimal entre le spectre de fluorescence du donneur et le spectre d'absorption de l'accepteur. L'efficacité du transfert d'énergie dépend également de la distance entre le donneur et l'accepteur. Ainsi, la détection du signal de fluorescence de l'accepteur est représentative de la proximité des deux molécules.

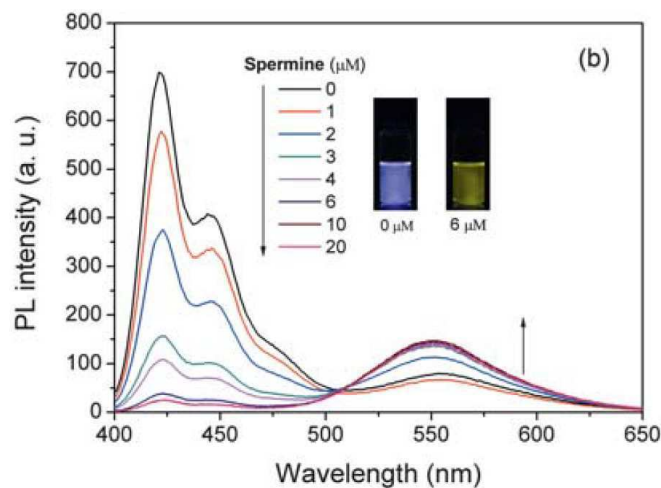
Un exemple de FRET pour la détection de diamines et de polyamines est réalisé par l'équipe de Bao *et al.* avec un polymère à base de polyfluorène fonctionnalisé avec des groupements acides carboxyliques et contenant des unités benzo[2,1,3]thiadiazole (Figure 79(a)). [264] Dans le diméthylsulfoxyde (DMSO), les interactions électrostatiques entre les diamines et les fonctions acides carboxyliques du polyfluorène entraînent la formation de pelotes qui rapprochent les fluorènes (donneurs) des benzothiadiazoles (accepteurs) comme illustré sur la Figure 79(b). Une détection par FRET est alors possible et l'émission de fluorescence passe du bleu à l'orange lors de la détection des polyamines (Figure 79(c)).



(a)



(b)



(c)

Figure 79 : (a) Structure du polymère PFCOOH-BT₅ à base de polyfluorène fonctionnalisé avec des groupements acide carboxylique (PFCOOH) et de benzo[2,1,3]thiadiazole (BT) ; (b) Schéma de principe de la détection de polyamines ; (c) Spectres d'émission de fluorescence des échantillons contenant différentes concentrations de spermine. [264]

II.3.2. Mesure d'absorption

La détermination d'histamine dans une matrice alimentaire par réaction avec le 2,3-naphtalènedicarboxaldéhyde (NDA), à pH = 6 en milieu non réducteur a été rapportée. Cette réaction présente l'avantage de former un produit coloré absorbant à $\lambda = 552$ nm (le NDA absorbe à $\lambda = 262$ nm). Bien que le temps de réponse soit court (10 minutes), la méthode est

peu sensible (25 mg/kg de thon). De plus, une étude des interférents montre que la sérotonine, une hormone possédant deux fonction amines, interagit avec le NDA. [265]

En 1982, Subramanian *et al.* [266] ont mis au point une méthode de détection basée sur les interactions non covalentes pouvant avoir lieu entre le *Cibacron blue* et des polyamines comme la spermine. Le spectre différentiel obtenu à partir des spectres d'absorption du *Cibacron blue* et du complexe *Cibacron blue*/polyamines présente une absorption maximale à 685 nm. Le *Cibacron Blue* n'étant plus commercialisé aujourd'hui, des molécules analogues comme le *Reactive Blue 4* (CAS 13324-20-4) ou le *Reactive Blue 19* (CAS 2580-78-1) pourraient être pressenties pour ce genre de détection (Figure 80).

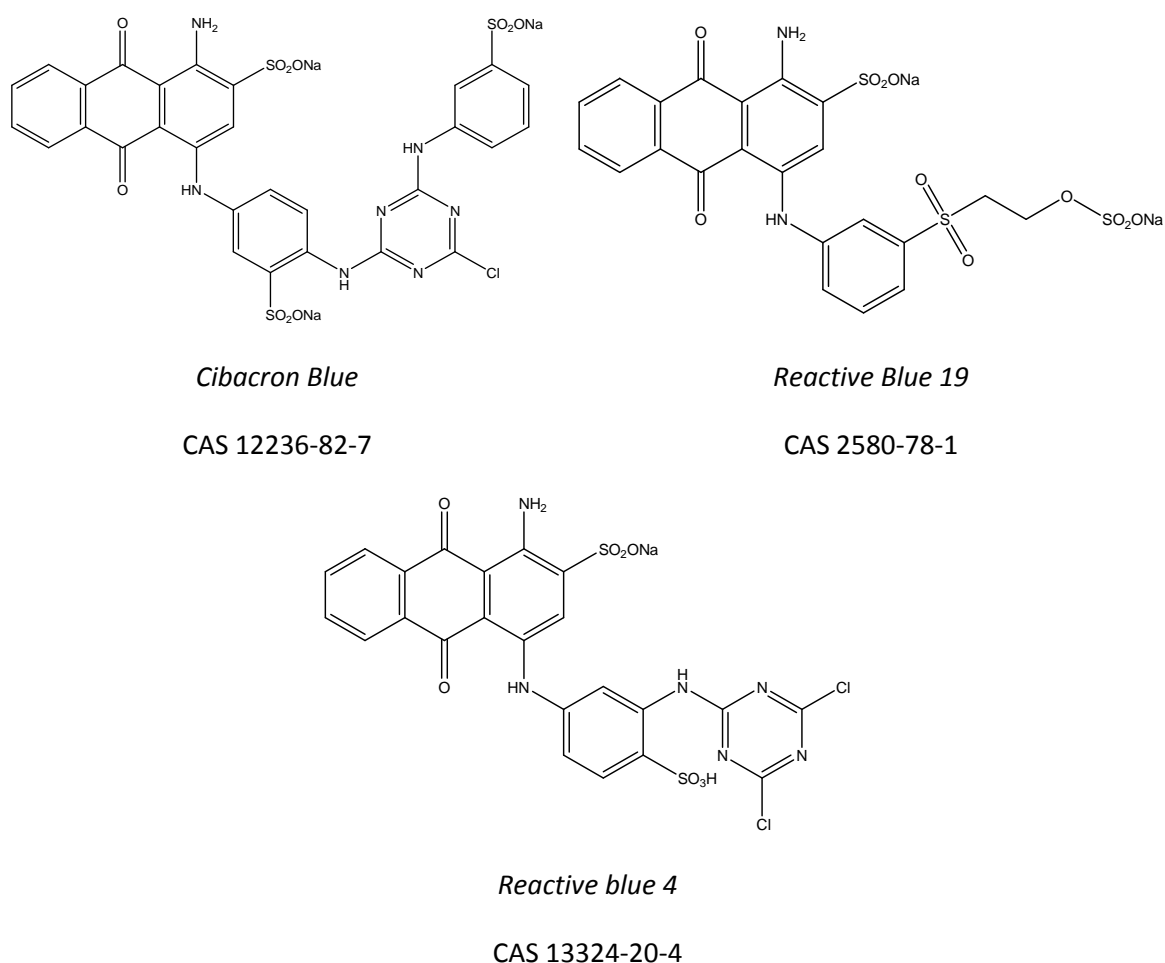


Figure 80 : Structures du *Cibacron Blue* et de deux de ses analogues pressenties pour la détection d'amines.

Le même principe a été repris en 2006 par Lu, [267] qui propose une détection en fluorescence de plusieurs amines aliphatiques par interactions non covalentes avec le Naphthol AS-BI déméthylé (7-bromo-3-hydroxy-2-naphth-*o*-hydroxyanilide). Quelques ppm de diamines peuvent ainsi être détectées.

Pour augmenter la sensibilité de la détection d'amines, l'utilisation de support poreux pour concentrer les réactifs est une stratégie en plein essor. Comes *et al.* [268] ont mis au

point des silices mésoporeuses greffées avec le 4-(4-aminophényl)-2,6-diphénylpyrylium capable de discriminer les amines primaires. Le solide ainsi obtenu est broyé puis mis en suspension dans des solutions aqueuses d'amines primaires. Chaque échantillon solide contient 0,63 mg de dérivé pyrylium (soit 1,90 mmol) et est exposé à 250 équivalents d'amine (soit 475 mmol). La détection en solution se traduit par un déplacement du pic d'absorption de 540 à 460 nm en présence d'un large excès d'amine. Les auteurs ne précisent pas la limite de détection obtenue.

L'incorporation de 3-carbonyl-4-hydroxy-7-N,N-diméthylcoumarine dans un film de poly (méthacrylate de méthyle) par l'équipe de Boram Lee [214] permet également la détection d'amines biogènes. L'apparition du produit de la réaction entre le dérivé de coumarine et les amines se traduit par une décoloration (le pic maximal d'absorption se déplace de 451 nm vers 377 nm). Ce même produit émet une fluorescence à 470 nm pour une excitation à 377 nm. L'étude préliminaire en solution montre que la réaction de détection n'a lieu que pour un fort excès d'amine (10 μ M de dérivé de coumarine pour une gamme de 100 μ M à 1,2 mM d'histamine). Le film de poly(méthacrylate de méthyle) placé dans le bouchon d'un flacon de 24 mL contenant 500 μ L d'une solution aqueuse de n-butylamine à 25% (soit 56 100 ppm) réagit aussi pour de fortes concentrations de n-butylamine, mais permet toutefois une détection en phase gazeuse.

Bien que novatrices, ces méthodes ne sont pas sélectives.

II.4. Choix de la molécule sonde

Parmi les méthodes existantes de détection des amines biogènes, l'utilisation de réactifs de dérivation chimique dans un matériau poreux pour augmenter la sensibilité, semble la plus prometteuse. Cependant ces réactions de dérivation sont lentes, nécessitent un chauffage (dansyl et dabsyl) et conduisent parfois à des produits peu stables (*o*-phthaldéhyde). La sélectivité des enzymes est intéressante mais leur structure est très fragile et leur activité dans des matrices inorganiques n'a été étudiée qu'en solution. A une détection colorimétrique comme celle obtenue avec un complexe de métallique ou le 2,3-naphtalènedicarboxaldéhyde, on préférera une détection en fluorescence qui est plus sensible.

La réaction de détection des amines avec les dérivés de coumarine implique la formation de liaisons covalentes, tandis que la méthode de Lu utilisant le Naphthol AS-BI déméthylé (7-bromo-3-hydroxy-2-naphth-*o*-hydroxyanilide) implique des liaisons non-covalentes (Figure 81). Cette dernière est retenue afin d'obtenir un capteur d'amines biogènes fluorescent et, éventuellement, réutilisable.

Le principe de détection repose sur la modification de la fluorescence du composé Naphthol AS-BI déméthylé en fonction des interactions non covalentes de type liaison hydrogène avec les amines. En effet, le Naphthol AS-BI déméthylé se comporte comme un accepteur de liaisons hydrogène via ses groupements hydroxyle et carbonyle. Les amines

biogènes se comportent comme des donneurs de liaisons hydrogène via leurs fonctions amines.

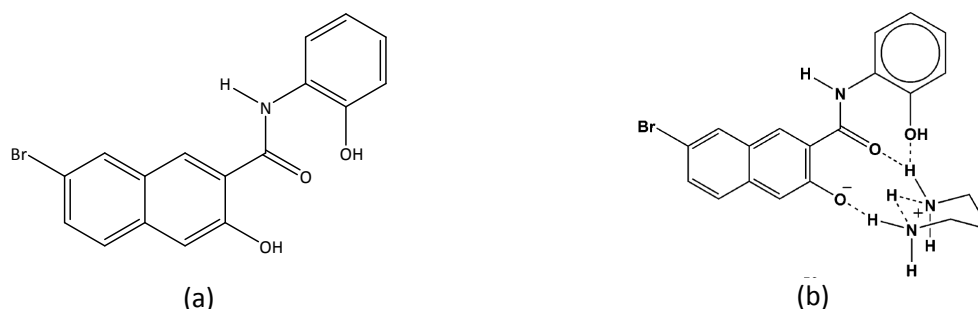


Figure 81. (a) Structure du Naphthol AS-BI déméthylé. (b) Interaction entre le Naphthol AS-BI déméthylé et la cadavérine (1,3-diaminopropane). [267]

Le complexe ainsi formé absorbe à 427 nm et émet une fluorescence centrée autour de 525 nm pour une excitation à 335 nm. [267] L'intensité de fluorescence du complexe évolue selon l'amine détectée car elle dépend de la longueur de la chaîne carbonée entre les deux fonctions amines de l'amine biogène. De par leur structure (longueur de la chaîne aliphatique entre les deux amines), la putrescine et la cadavérine forment avec le Naphthol AS-BI déméthylé les complexes les plus stables et sont préférentiellement détectées (Figure 82).

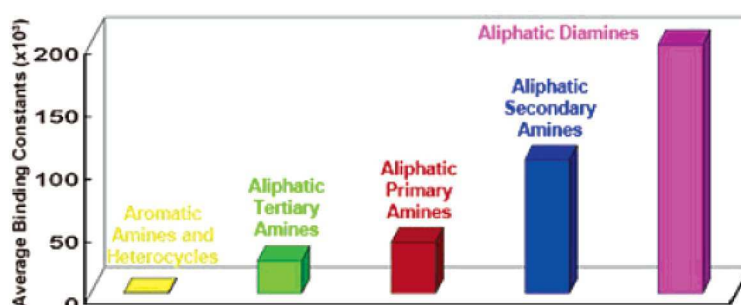


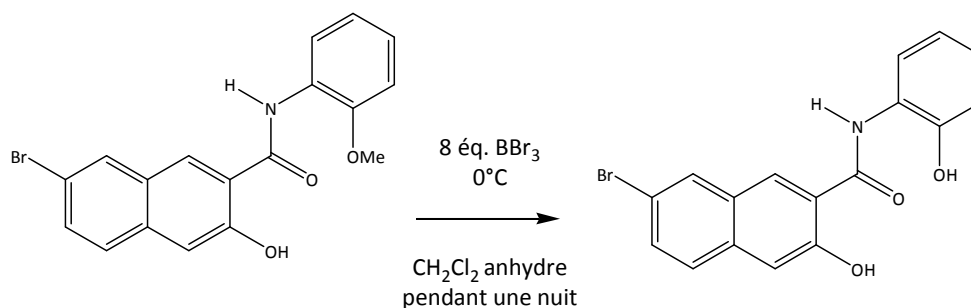
Figure 82 : Affinité du Naphthol AS-BI déméthylé pour différentes amines (aliphatique, primaires, secondaires, tertiaires, etc). [267]

Ces interactions pourraient être exaltées dans un milieu confiné comme les pores nanométriques d'un matériau poreux. Pour optimiser le milieu environnant (proticité, polarité, pH...) nécessaire à ces interactions, nous nous sommes tout d'abord intéressés à la réaction de complexation en milieu liquide. Par ailleurs, le Naphthol AS-BI déméthylé n'étant pas commercialisé, une première étape a été la synthèse de ce composé.

III. Etude en solution

III.1. Synthèse et caractérisation de la molécule sonde Naphthol AS-BI déméthylé

Le protocole de synthèse de la molécule sonde est décrit dans l'article de Lu. Il a été suivi sans modification. La molécule sonde est obtenue par déméthylation du Naphthol AS-BI comme présenté dans l'Équation 6.



Équation 6 : Réaction de déméthylation du Naphthol AS-BI

Une purification par chromatographie sur colonne permet d'obtenir un produit pur à 99,0 % avec un rendement total de 30 %. Sa structure est confirmée par RMN du proton. (Voir Annexe 13).

III.2. Etude en absorption

Le Naphthol AS-BI déméthylé est étudié en absorption et en fluorescence, seul puis en présence de cadavérine. L'étude est menée dans l'acétonitrile afin de reproduire les résultats de Lu, mais aussi dans l'éthanol pour reproduire un environnement similaire à celui d'une matrice de silicate. En effet, la surface des pores d'un matériau à base de silicate synthétisé par voie sol-gel présente des groupements silanol, résidus d'une polycondensation incomplète des alcoxydes de silicium. La stœchiométrie du complexe est ensuite déterminée dans l'acétonitrile anhydre grâce à la méthode de Job.

III.2.1. Etude de l'interaction dans l'acétonitrile et l'éthanol

Les propriétés optiques du Naphthol AS-BI déméthylé (Ar-OH) sont étudiées en solution dans l'acétonitrile et l'éthanol.

Les solutions préparées avec l'acétonitrile sont incolores. Le spectre d'absorption d'Ar-OH présente un pic à 305 nm et un épaulement à 365 nm (Figure 83). Il est important de noter que la molécule sonde n'absorbe pas au-delà de 420 nm. Dans l'éthanol, Ar-OH absorbe à 320 nm et 370 nm (épaulement). Une faible absorption centrée autour de 410 nm est également observée ce qui explique la couleur jaune pâle des solutions (Figure 83). L'origine de cette absorption sera expliquée ultérieurement.

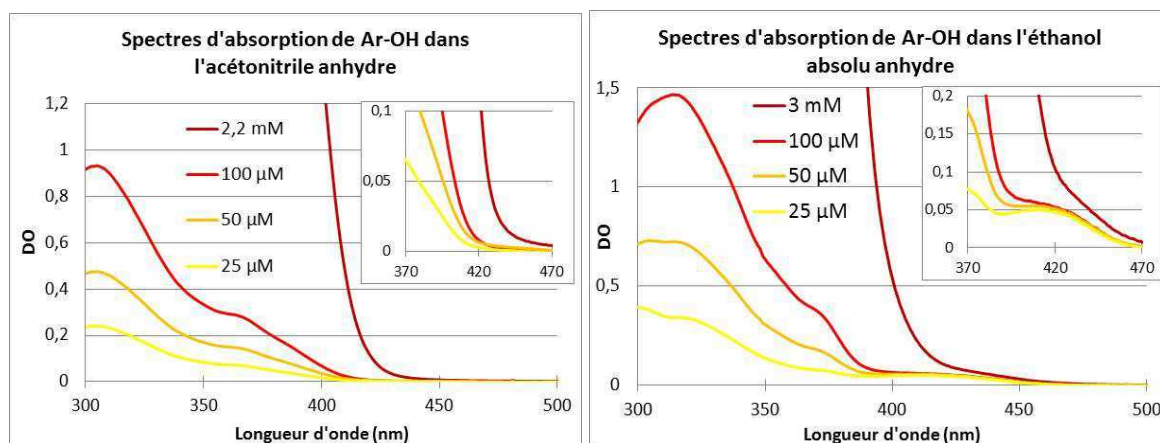


Figure 83 : Spectres d'absorption du Naphthol AS-BI déméthylé (Ar-OH) a différentes concentrations dans l'acétonitrile et l'éthanol.

Les coefficients d'extinction molaire de la molécule sonde (Ar-OH) et de la cible (cadavérine) ont été déterminés dans l'acétonitrile et dans l'éthanol (Tableau 17, Annexe 6.4.). Dans l'acétonitrile, le coefficient d'extinction molaire de la molécule sonde à 433 nm est faible ($\epsilon_{Ar-OH,433\text{ nm,ACN}} = 71 \pm 0,6 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) et la cadavérine n'absorbe pratiquement pas. Dans l'éthanol, le coefficient d'extinction molaire de la molécule sonde à 433 nm est un peu plus élevé ($\epsilon_{ArOH,433\text{ nm,EtOH}} = 150 \pm 2 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$), ce qui est dû à la présence de liaisons hydrogène entre la molécule sonde et le solvant, comme nous le montrerons ultérieurement.

Ar-OH			
Acétonitrile		Ethanol	
335nm	433nm	335nm	433nm
5120 ± 45 L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹	71 ± 0,6 L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹	9960 ± 123 L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹	150 ± 2 L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹
Cadavérine			
Acétonitrile			
335nm	433nm		
18 ± 0,4 L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹	3,5 ± 0,08 L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹		

Tableau 17 : Coefficients d'extinction molaire d'Ar-OH et de la cadavérine dans l'éthanol et dans l'acétonitrile.

Des mélanges équimolaires de cadavérine et d'Ar-OH sont ensuite préparés afin de former le complexe ($[ArOH] = [cadavérine] = 50 \mu\text{M}$). Les solutions dans l'acétonitrile deviennent jaune pâle et le pic d'absorption du complexe apparaît à 433 nm (D'après Lu, $\lambda_{\text{max}} = 427 \text{ nm}$, Figure 84). Dans l'éthanol, l'intensité du pic à 410 nm augmente et aucun pic supplémentaire n'est observé.

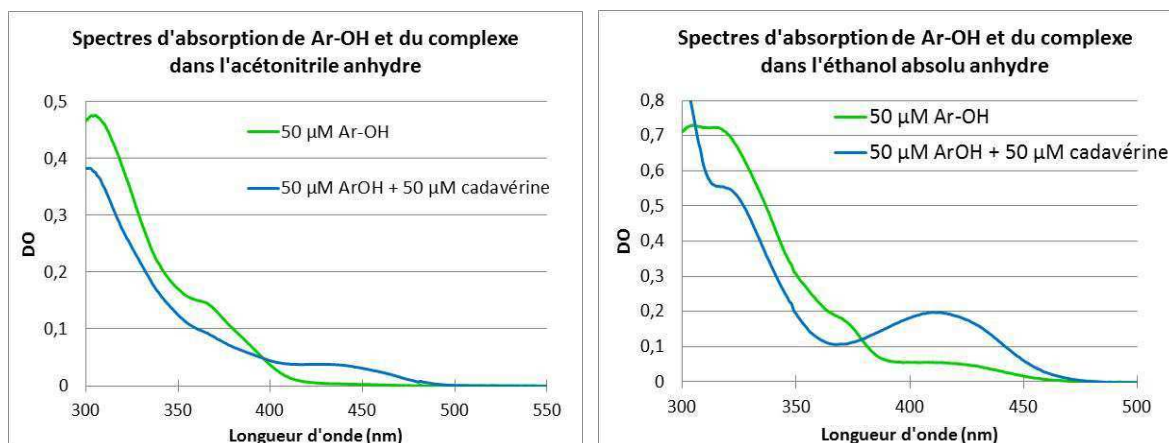


Figure 84 : Spectres d'absorption du Naphthol AS-BI déméthylé (Ar-OH) et de son complexe avec la cadavérine (stœchiométrie 1/1) dans l'acétonitrile et l'éthanol.

La formation du complexe repose sur l'existence d'interaction hydrogène entre la molécule sonde et la cadavérine. D'après les spectres de la Figure 84, il semble que Ar-OH établisse des liaisons hydrogène avec l'éthanol (solvant protique polaire) ce qui explique l'apparition d'une nouvelle bande d'absorption à 410 nm. En présence de cadavérine, le complexe Ar-OH/cadavérine est préférentiellement formé et absorbe à la même longueur d'onde ($\lambda = 410 \text{ nm}$), ce qui confirme l'interaction par liaison H entre ArOH et la cadavérine.

Pour déterminer la stœchiométrie du complexe Ar-OH/cadavérine, nous allons étudier plus en détail les mélanges de ces réactifs dans un solvant aprotique, l'acétonitrile.

III.2.2. Détermination de la stœchiométrie du complexe : Méthode de Job

La méthode de Job permet de déterminer graphiquement la stœchiométrie d'un complexe formé en solution (voir Annexe 14). Plusieurs solutions d'Ar-OH et de cadavérine en proportions différentes sont préparées dans l'acétonitrile anhydre. A partir de leurs spectres d'absorption, et notamment de la mesure de la DO à $\lambda_{\text{complexe}} = 433 \text{ nm}$, il est possible de tracer le graphe de Job.

Les valeurs de DO à 433 nm sont introduites dans la fonction de Job $F(x) = d(x) / (C_A - (1-x) \cdot \epsilon_A - x \cdot \epsilon_B)$, qui est tracée en fonction de x , la fraction molaire en cadavérine (Figure 85). L'écart maximal entre l'absorbance totale de la solution et la somme des absorbances de chacun des composés est obtenu pour $x = 0,5$ ce qui signifie que la stœchiométrie du complexe Ar-OH/cadavérine est de 1/1.

L'étude approfondie du diagramme de Job établi dans l'acétonitrile anhydre (Figure 85(c)) permet d'obtenir une estimation du coefficient d'extinction molaire du complexe.

$F(x)$ peut être exprimé selon (voir Annexe 14) :

$$F(x) = (\epsilon_{\text{complexe}} - \epsilon_{\text{cadavérine}} - \epsilon_{\text{ArOH}})x \text{ pour } 0 < x < 1/2 \text{ et}$$

$$F(x) = (\epsilon_{\text{complexe}} - \epsilon_{\text{cadavérine}} - \epsilon_{\text{ArOH}})x - (\epsilon_{\text{ArOH}} + \epsilon_{\text{cadavérine}} - \epsilon_{\text{complexe}})$$

Au point d'intersection des deux droites, à $x = 0,5$, $F(x) = \frac{1}{2} (\epsilon_{\text{complexe}} - \epsilon_{\text{cadavérine}} - \epsilon_{\text{ArOH}})$

$$\text{Pour } x = 0,5 : F(0,5) = (\epsilon_{\text{complexe}} - \epsilon_{\text{cadavérine}} - \epsilon_{\text{ArOH}}) \cdot 0,5 = 1447$$

Donc $\epsilon_{\text{complexe}} = 2970 \pm 280 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$

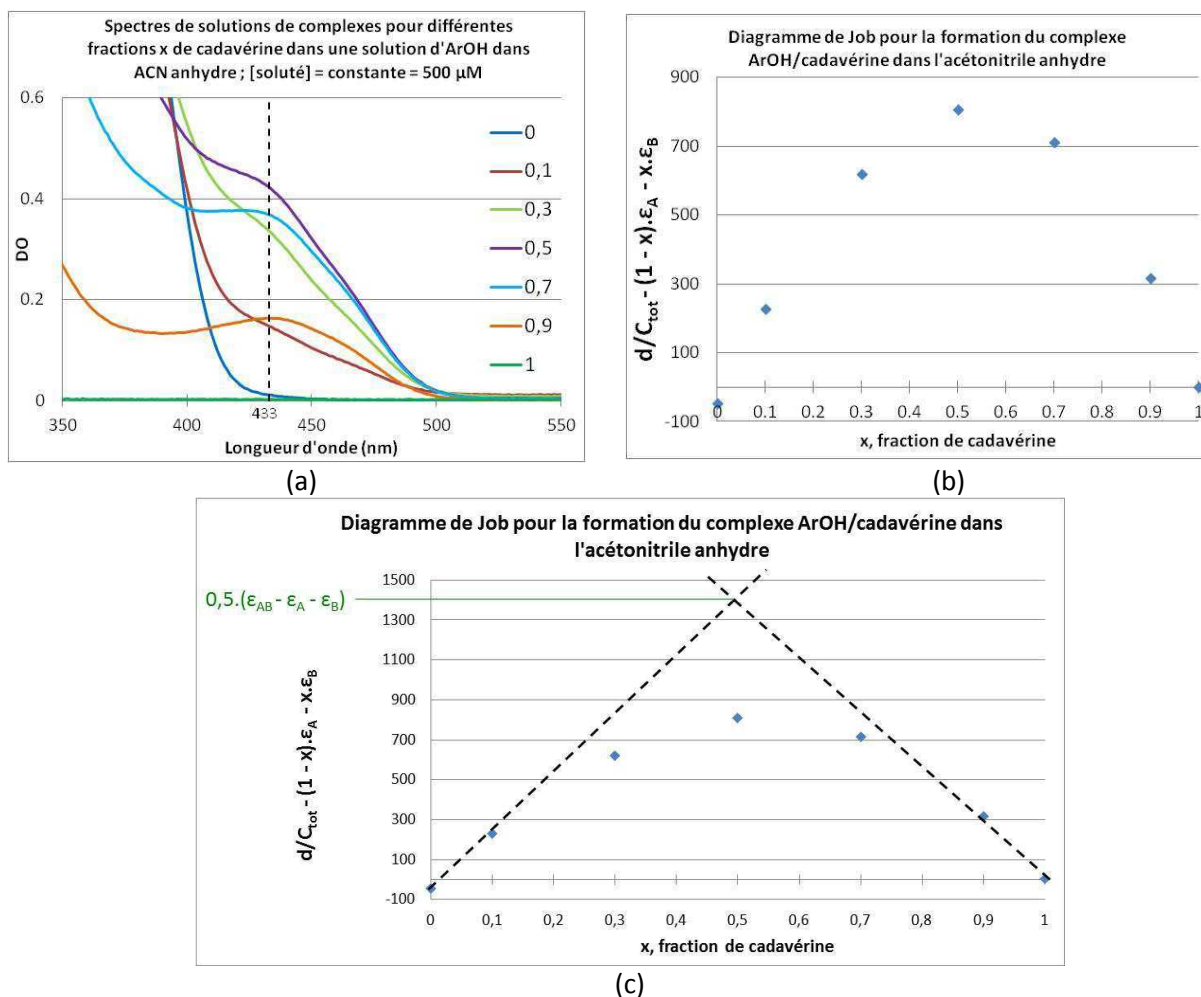


Figure 85 : (a) Spectres d'absorption des mélanges d'Ar-OH et de cadavérine pour différents x. (b) Graphe de Job pour $C_{\text{tot}} = 500 \mu\text{M}$. Le maximum des points est obtenu pour $x = 0,5$: le complexe Ar-OH/cadavérine est de stœchiométrie 1/1. (c) Détermination graphique de $\epsilon_{\text{complexe}}$ à $x = 0,5$.

La valeur du coefficient d'extinction molaire déterminé avec la méthode de Job est $\epsilon_{\text{complexe},433\text{nm},\text{Job}} = 2970 \pm 280 (\text{mol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1})$

La constante d'association K_a du complexe s'écrit l'Équation 7:

Équation 7 :

$$K_a = \frac{[\text{complexe}]_{\text{éq}}}{[\text{ArOH}]_{\text{éq}} \cdot [\text{cadavérine}]_{\text{éq}}}$$

Elle peut être évaluée à partir des données expérimentales obtenues pour le graphe de Job. En effet, la concentration en complexe à l'équilibre peut être calculée à partir de la DO à 433 nm et du coefficient d'extinction molaire que nous venons de déterminer. Pour la fraction molaire de cadavérine $x = 0,9$, $DO_{433\text{nm}}$ est déterminée graphiquement à partir de la Figure 85(a) en prenant soin de soustraire non seulement la contribution d'ArOH ($DO \approx 0,012$) mais aussi la ligne de base due à la forte absorption du complexe vers 310 nm ($DO \approx 0,02$).

$$[complexe]_{\acute{e}q} = \frac{DO_{433\text{ nm}}}{\epsilon_{433\text{ nm}}} = 44,5 \pm 4 \mu\text{M}$$

Les concentrations en ArOH et cadavérine à l'équilibre correspondent aux concentrations introduites expérimentalement à t=0 ([ArOH] = 50 μM et [cadavérine] = 450 μM) retranchées de la concentration en complexe formé. La constante d'association K_a devient alors :

$$K_a = \frac{[complexe]_{\acute{e}q}}{([ArOH]_{t0} - [complexe]_{\acute{e}q}) \cdot ([cadavérine]_{\acute{e}q} - [complexe]_{\acute{e}q})} = 19900$$

$$K_a = 19900 \pm 1530 \text{ M}^{-1}$$

Cette valeur n'est pas élevée comme on pourrait s'y attendre d'après l'allure de la courbe de Job (Figure 85(c)). [269] Si la constante d'association du complexe était forte, les points de la courbe de Job devraient être très proches de ceux des 2 droites en pointillé, ce qui n'est actuellement pas le cas.

La valeur de K est 14,5 fois plus faible que celle déterminée par Lu en spectrophotométrie de fluorescence ($K = 290\,000$). Cet écart pourrait être expliqué par les différences de propriétés acido-basiques de Ar-OH dans son état fondamental et excité. Les interactions entre ArOH et la cadavérine seraient selon Lu exaltées en fluorescence du fait des propriétés photochimiques de ArOH. ArOH est un photoacide, ce qui signifie que son acidité augmente lorsque la molécule est portée dans un état excité. Le pK_a^* du naphthol est de 2,8 comparativement à $pK_a = 9,2$ à l'état fondamental. Ainsi, Ar-OH* est environ 10^6 fois plus acide que Ar-OH et donc plus prompt à former un complexe avec la cadavérine ou à transférer son proton à l'amine.

Une meilleure sensibilité de détection pourrait donc être obtenue Par des mesures de fluorescence. Cette étude est l'objet du paragraphe suivant.

III.3. Etude en spectrophotométrie de fluorescence

La fluorescence du complexe dans l'acétonitrile anhydre et dans l'éthanol absolu anhydre est collectée pour une excitation à $\lambda_{ex} = 433 \text{ nm}$. Le rendement quantique de fluorescence dans l'acétonitrile est ensuite déterminé en utilisant une molécule fluorescente de référence : la quinine sulfate dihydrate.

III.3.1. Etude des propriétés des états excités de Ar-OH et du complexe Ar-OH/Amine dans l'acétonitrile et l'éthanol

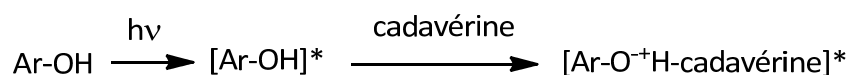
Dans l'acétonitrile, la bande de fluorescence de Ar-OH s'étend de 475 à 700 nm avec un maximum centré à $\lambda_{\acute{e}m} = 526 \text{ nm}$. On trouve celle du complexe dans le même domaine de longueur d'onde avec un maximum légèrement déplacé à $\lambda_{\acute{e}m} = 530 \text{ nm}$ (littérature :

$\lambda_{\text{ex}} = 335 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{ém}} = 527 \text{ nm}$). [267] Ar-OH émet peu de fluorescence par rapport à son complexe. Le complexe dans l'acétonitrile est très fluorescent (Figure 86(a)). Pour expliquer cette différence, l'interprétation donnée par Lu *et al.* est que ArOH* excité transfère son proton à l'amine ; ainsi c'est la paire d'ion, $\text{ArO}^{\cdot-} \cdots \text{Hcadavérine}$ dans l'acétonitrile qui fluorescerait avec un rendement plus élevé que celui de $\text{ArO}^{\cdot-} \cdots \text{Hcadavérine}$ dans l'état fondamental.

Dans l'éthanol, ArOH interagit avec le solvant par liaisons H. Ce phénomène induit l'apparition d'une bande d'absorption centrée à 410 nm. ArOH est fluorescente dans l'éthanol et émet entre 450 et 700 nm avec un maximum centré à $\lambda_{\text{ém}} = 525 \text{ nm}$ (Figure 86(b)). Son intensité de fluorescence est plus élevée que dans l'acétonitrile. Lors de l'ajout de la cadavérine, celle-ci vient remplacer les molécules d'éthanol en formant des liaisons H plus fortes avec Ar-OH. Ce phénomène n'induit pas une évolution spectrale mais uniquement une augmentation de l'intensité de la bande d'absorption centrée à 410 nm. Lors de l'excitation de ArOH/cadavérine, la bande de fluorescence du complexe ne change pas et seule son intensité augmente.

Ces résultats nous amène à rediscuter l'interprétation de Lu *et al.* Lu propose trois mécanismes possibles A, B et C :

A : Transfert de proton à l'état excité



B : Transfert de proton à l'état fondamental



C : Liaisons hydrogène à l'état fondamental



L'auteur rejette le mécanisme B, qui fait intervenir un transfert de proton dans l'état fondamental. La raison évoquée est que Ar-OH est un acide trop faible dans l'état fondamental. Ce raisonnement nous paraît correct, d'autant plus que si le naphthol est déjà sous sa forme naphtholate et l'amine est protonée, dans l'état excité le transfert de proton de $\text{Ar-O}^{\cdot-}$ à la cadavérine ne pourrait avoir lieu. En revanche, on s'attendrait à avoir un transfert intramoléculaire de la charge du naphtholate qui est une base forte vers le cycle, diminuant ainsi la basicité du naphthol et donc l'interaction entre Ar-OH* et la cadavérine. Les expériences de Lu en revanche ne lui permettent pas de conclure définitivement entre les mécanismes A et C, d'autant plus que l'auteur fait remarquer qu'il n'a pas utilisé de solvant anhydre et que l'acétonitrile contient de l'eau. Avec les résultats que nous avons obtenus avec un solvant protique, l'éthanol, nous pouvons conclure que c'est le mécanisme C qui prévaut, avec formation uniquement de liaison H entre Ar-OH et la cadavérine dans

l'état fondamental. En effet, le complexe formé à l'état fondamental entre Ar-OH et la cadavérine présente la même bande d'absorption centrée à 410 nm que Ar-OH seul dans l'éthanol, avec cependant une intensité plus forte. Or Ar-OH ne peut transférer un proton à un solvant tel que l'éthanol, mais peut former des liaisons H avec ce solvant. Par ailleurs, on observe une fluorescence beaucoup plus élevée du complexe dans l'éthanol comparativement à celle de Ar-OH dans ce solvant, ce qui tend à prouver que le transfert de proton a bien lieu dans l'état excité du complexe à liaisons H. Il convient maintenant d'évaluer le rendement quantique de fluorescence du complexe et d'estimer la sensibilité de la détection de la cadavérine.

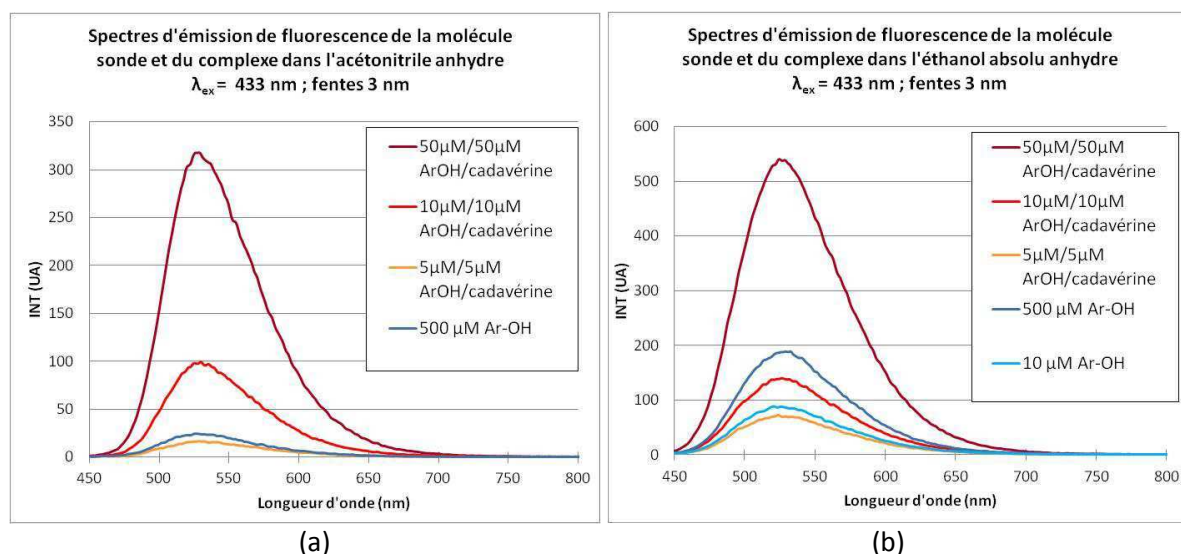


Figure 86 : (a) Spectres d'émission de fluorescence d'Ar-OH et de son complexe dans l'acétonitrile ; $\lambda_{ex} = 433$ nm. (b) Spectres d'émission de fluorescence d'Ar-OH et de son complexe dans l'éthanol ; $\lambda_{ex} = 433$ nm.

III.3.2. Calcul du rendement quantique de fluorescence des différentes espèces mises en jeu.

Le rendement quantique de fluorescence ϕ d'une molécule représente le ratio de photons émis en fluorescence par rapport au nombre de photons absorbés pendant l'excitation de la molécule. La valeur de ϕ dépend donc de la capacité à absorber les photons (ϵ) et à les réémettre. ϕ peut être déterminé graphiquement en traçant l'aire sous le pic de fluorescence notée Aire_{fluo} (proportionnelle au nombre de photons émis en fluorescence) en fonction de la DO des solutions étudiées (proportionnelle au nombre de photons absorbés donc participant à l'excitation).

La quinine sulfate dihydrate dissoute dans 0,05 M H₂SO₄ est utilisée comme référence. [270] Elle possède un rendement quantique de fluorescence élevé de $\phi = 0,513 \pm 0,005$ dont la valeur est indépendante de la longueur d'onde d'excitation entre 400 et 600 nm. [271] Le rendement quantique de fluorescence du complexe dans l'acétonitrile est déterminé par comparaison, en excitant les deux composés à la même longueur d'onde. Le rendement de fluorescence du complexe est déterminé en appliquant la relation :

$$\Phi_{\text{complexe}} = \Phi_{\text{ref}} \frac{\text{Aire}_{\text{complexe}} (1 - 10^{-DO_{\text{ref}}}) n_{\text{complexe}}^2}{\text{Aire}_{\text{ref}} (1 - 10^{-DO_{\text{complexe}}}) n_{\text{ref}}^2}$$

Où ϕ est le rendement quantique ; Aire, l'aire sous le spectre d'émission de fluorescence et n, l'indice de réfraction de la solution. L'indice ref se rapporte à la molécule de référence, ici la quinine sulfate dihydrate.

Les valeurs d'indice de réfraction sont introduites pour rendre compte de la différence de diffusion de lumière lorsque les solvants utilisés ne sont pas les mêmes. Dans le cas présent, à 20°C, le rapport des indices de réfraction vaut 1 : $n_{\text{complexe}} = n_{\text{ACN}} = 1,341$ [272] et $n_{\text{ref}} = n_{0,05 \text{ M H}_2\text{SO}_4} \approx 0,34$. [273] A cet effet, les courbes $\text{Aire}_{\text{fluo}} = f(\text{DO})$ sont établies pour les deux composés (Annexe 8.2).

Le rendement quantique de fluorescence de ArOH et du complexe dans l'acétonitrile ainsi déterminé vaut respectivement $\phi_{(\text{ArOH}, 433\text{nm})} = 8.10^{-3} \pm 3.10^{-3}$ et $\phi_{(\text{complexe}, 433\text{nm})} = 0,075 \pm 0,02$ (Figure 87 et Tableau 18) ce qui est convenable, pour ce dernier, pour une détection en fluorescence. A titre d'exemple, Dagnélie *et al.* utilisent une molécule, la 3,5-diacétyl-1,4-dihydrotoluidine, de rendement quantique de fluorescence de $\phi = 0,03$ pour la détection de formaldéhyde par méthode spectrofluorimétrique. Les auteurs obtiennent une limite de détection de 5 ppb en 3 minutes et de 400 ppt en 20 min avec un capteur fortement dopé de molécule-sonde. [274]

Comme Ar-OH et son complexe avec la cadavérine dans l'éthanol sont fluorescents, $\text{Aire}_{\text{fluo}} = f(\text{DO})$ est tracé afin d'estimer la différence entre leur rendement quantique de fluorescence (Figure 88). Les pentes obtenues sont les mêmes ($\text{pente}_{\text{ArOH}} = \text{pente}_{\text{complexe}} = 8.10^5$), aux concentrations de réactifs utilisées. A ces concentrations, les solutions sont si diluées que la complexation entre Ar-OH et la cadavérine n'a pas lieu. En effet, les conditions expérimentales nécessaires aux mesures de rendement quantique, ne permettent pas l'utilisation de solutions concentrées de ArOH, en raison de problème de réabsorption de la fluorescence par le composé dans le domaine de longueur d'onde où les spectres d'absorption et de fluorescence se chevauchent.

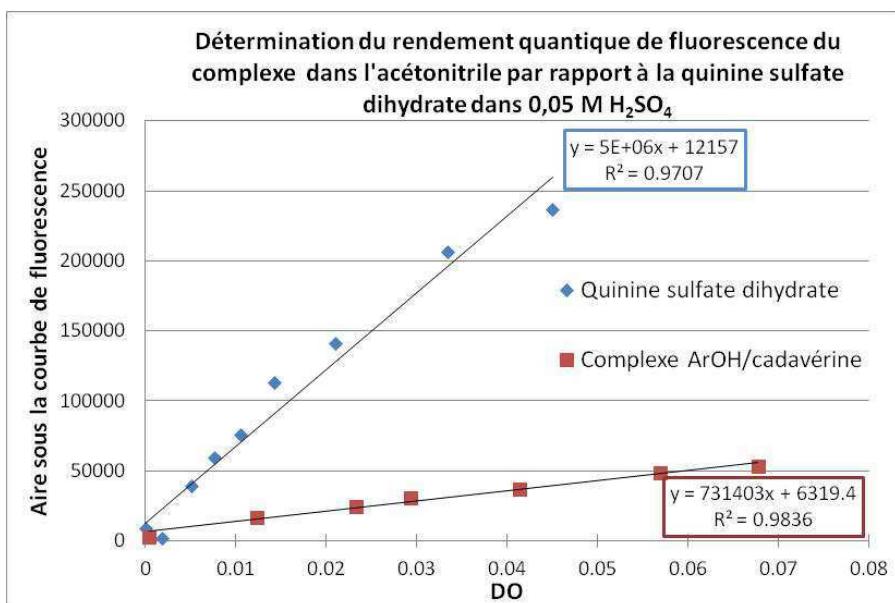


Figure 87 : Comparaison des pentes Aire=f(DO) entre la QS dans 0,5 M H₂SO₄ et le complexe dans l'acétonitrile

Composé	QS dans 0,05 M H ₂ SO ₄	ArOH dans ACN	Complexe dans ACN	ArOH dans EtOH
Pente	$5.10^6 \pm 1.10^6$	$7,4.10^4 \pm 1,5.10^4*$	$7.10^5 \pm 7.10^4$	$8.10^5 \pm 1.10^5$
ϕ	$0,513 \pm 0,005$	$8.10^{-3} \pm 3.10^{-3}*$	$0,075 \pm 0,02$	$8.10^{-2} \pm 2.10^{-2}$

Tableau 18 : Calcul du rendement quantique de ArOH et du complexe ArOH/cadavérine 1/1 en prenant pour référence la quinine sulfate dihydrate. (*) valeur déterminée pour ArOH 500 μ M.

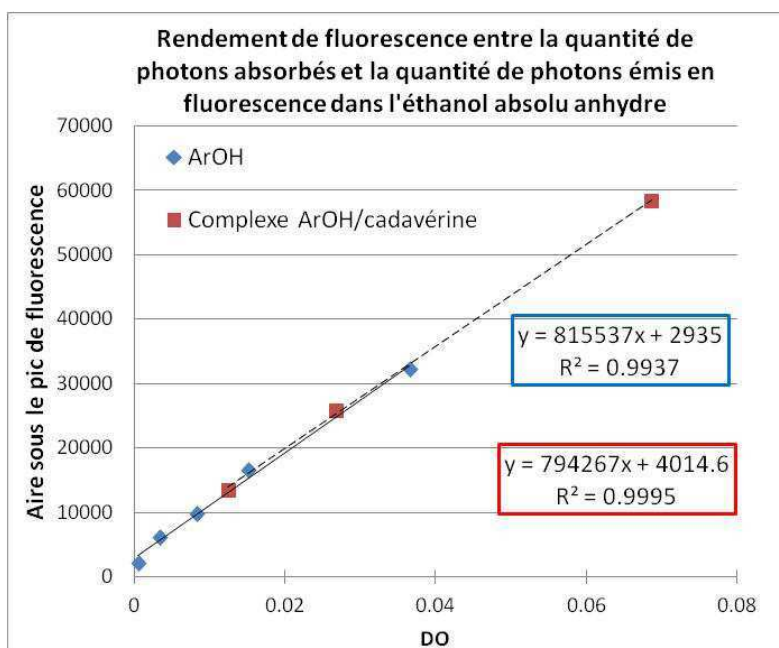


Figure 88 : Dans l'éthanol, comparaison des pentes Aire=f(DO) obtenues pour des solutions diluées de Ar-OH et des solutions équimolaires d'Ar-OH et de cadavérine.

Nous n'avons pas pu déterminer la constante d'association de $\text{ArO}^{\cdot-} \cdot \text{Hcadavérine}$, mais d'après la Figure 86, une valeur sur-évaluée de la limite de détection de la cadavérine dans l'acétonitrile serait de $5\mu\text{M}$, soit de ~ 250 ppb. En effet, un dopage important en Ar-OH devrait contribuer à favoriser la formation du complexe et abaisser cette limite de détection.

Les résultats obtenus pour la fluorescence de la molécule sonde et de son complexe avec la cadavérine dans l'éthanol révèlent que la molécule sonde peut établir des liaisons hydrogène avec le solvant, et probablement avec l'eau. Ces observations devront être prises en compte pour la détection en fluorescence. Cependant Lu et al. ont montré que l'addition de faible quantité d'eau au solvant n'affecte que peu la fluorescence du complexe, dont l'intensité est légèrement diminuée. Ces résultats sont encourageants car ils laissent présager que l'humidité de l'air ou la vapeur d'eau provenant des cultures de bactéries n'affecteront que peu l'interaction entre Ar-OH et les amines biogènes, si ces dernières peuvent être piégées dans les pores d'un matériau dopé de Ar-OH.

IV. Synthèse de monolithes

En nous basant sur les résultats obtenus en phase liquide, il nous est apparu important de limiter le nombre de groupements Si-OH résiduels dans les matrices nanoporeuses dopées de Ar-OH. Une solution serait de rendre les surfaces intrapores aprotiques. L'utilisation de précurseurs méthylés du type $\text{Me-Si}(\text{OMe})_3$ (noté méthyl-TMOS) peut conférer au monolithe un caractère hydrophobe. L'introduction d'un précurseur phényle du type $\text{Ph-Si}(\text{OMe})_3$ (noté phényl-TMOS) est également envisagée car la fonction phényle permet non seulement de rendre la surface des pores hydrophobe mais aussi d'obtenir une grande taille de pore par son encombrement stérique. Un mélange de précurseurs méthyl- et phényl-TMOS est également envisagé pour faire varier la distribution de tailles des pores.

Un précurseur phényle, le triméthoxy-phénylsilane (noté Ph-TMOS, Figure 89), est utilisé afin d'incorporer des groupements phényle à la surface des pores pour agrandir leur taille et obtenir un environnement aprotique.

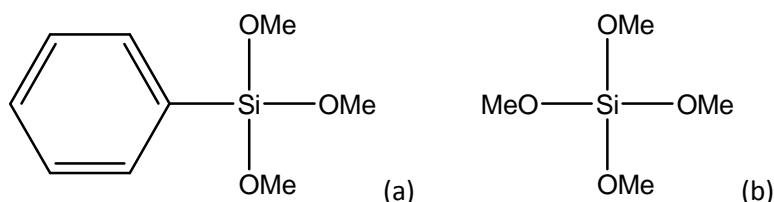


Figure 89 : Structure du triméthoxy-phénylsilane (a) et du tétraméthoxysilane (b).

L'utilisation de ce précurseur rend la préparation du sol difficile car il n'est pas ou est peu miscible à l'eau et au tétraméthoxysilane (noté TMOS, Figure 89). Un important volume de co-solvant, ici l'éthanol, est donc nécessaire mais il présente l'inconvénient de ralentir l'étape de gélification.

Plusieurs formulations incorporant du Ph-TMOS sont testées (Tableau 19).

N° essai	Ratio TMOS/PhTMOS	EtOH	Eau
1	0,9/0,1	4	4
2	0,5/0,5	4	4
3	0/1	4	4
4	0,9/0,1	0	3,9
5	0,5/0,5	0	3,5
6	0/1	0	3
7	0,9/0,1	1	3,9
8	0,5/0,5	1	3,5
9	0,9/0,1	2	3,9
10	0,9/0,1	3	3,5
11	0,5/0,5	2	3,9
12	0,5/0,5	3	3,5

Tableau 19 : Composition des différentes formulations de réactifs testées pour l'élaboration du capteur de cadavérine. Seules les formulations en gras permettent d'obtenir un sol homogène.

Il n'est pas possible d'incorporer plus de 10% de Ph-TMOS dans le sol (essais 1 et 10). Au-delà de cette teneur, le sol est inhomogène et conduit à des monolithes opaques (essais 2, 4-9, 11 et 12 ; Figure 90). Il se peut que le précurseur phényl-TMOS précipite pendant la gélification.

Les formulations utilisant un seul précurseur, le Ph-TMOS, ne permettent pas d'aboutir à une gélification. Après plusieurs semaines, le sol est toujours liquide (essai 3).

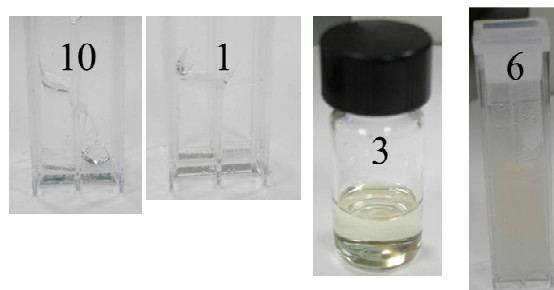


Figure 90 : Photos des monolithes 10 et 1 transparents ; photo du monolithe 6 opaque et photo du sol (essai 3) resté liquide.

Les paramètres de porosité ont été caractérisés pour les monolithes 1 et 10. Ils présentent respectivement des surfaces spécifiques de 470 et 460 m²/g et une taille de pores répartie entre 10 et 20 Å.

L'hydrophobicité des monolithes n'a pas été testée. Elle pourrait facilement être mise en évidence, par exemple, en exposant les monolithes à des atmosphères de différentes hygrométries puis en effectuant une mesure par analyse thermo-gravimétrique (ATG). Cette technique consiste à mesurer les variations de masse d'un échantillon à mesure que les solvants (ici l'eau et des résidus d'éthanol et de méthanol) qu'il contient s'évaporent sous l'effet de la température.

Par manque de temps, les capteurs n'ont pas été exposés à des vapeurs de cadavérine.

V. Conclusion

Dans ce chapitre 3, nous avons souhaité mettre au point un capteur pour une amine biogène, la cadavérine. La molécule sonde choisie est le Naphthol AS-BI déméthylé (ArOH) car elle forme en présence de cadavérine, via des liaisons hydrogène, un complexe absorbant à 433 nm et émettant une fluorescence à 530 nm. N'étant pas disponible commercialement, la molécule sonde a été synthétisée par déméthylation du Naphthol AS-BI avec un rendement de synthèse est de 30 %. Un produit de pureté 99,0 % a pu être obtenue et caractérisée en RMN du proton.

Les propriétés optiques de ArOH et de son complexe avec la cadavérine ont été étudiées en solution et ont permis de mieux comprendre les interactions mises en jeu. Dans l'acétonitrile, solvant aprotique, la stœchiométrie 1/1 du complexe ArOH/cadavérine ainsi que les valeurs du coefficient d'extinction molaire et de la constante d'association K , ont pu être déterminées par la méthode de Job. Le complexe présente une bande d'absorption dans l'UV-visible centrée autour de 433 nm ($\epsilon_{\text{complexe,ACN}} = 2970 \pm 280 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) et la constante d'association est $K_a = 19900 \pm 1530 \text{ M}^{-1}$. L'étude de la formation du complexe dans l'éthanol, solvant protique, a révélé l'influence du solvant dans la formation du complexe. En effet, il existe une compétition entre la cadavérine et l'éthanol pour l'établissement de liaisons hydrogène avec ArOH. En absence de cadavérine, ArOH présente une bande d'absorption centrée autour de 410 nm due à la complexation par liaison H d'ArOH avec le solvant. Lors de l'ajout de cadavérine, celle-ci vient remplacer les molécules d'éthanol en formant des liaisons H plus fortes avec Ar-OH. Ce phénomène est traduit par une augmentation du pic à 410 nm sans aucune variation spectrale.

L'étude en fluorescence a montré que la molécule sonde est peu fluorescente dans l'acétonitrile ($\phi_{\text{ArOH,ACN}} = 8.10^{-3} \pm 3.10^{-3}$) contrairement au complexe Ar-OH/cadavérine dont le rendement quantique de fluorescence est intéressant ($\phi_{\text{complexe,ACN}} = 0,075 \pm 0,02$). Cette différence est due au caractère photoacide du chromophore naphthol et un transfert de proton a lieu dans l'état excité de ArOH à la cadavérine. Cette augmentation de fluorescence est également visible lorsque le complexe est formé dans l'éthanol. Même si le Naphthol AS-BI déméthylé semble sensible aux environnements protiques, son interaction par liaisons-H avec la cadavérine reste privilégiée. Ce résultat est encourageant pour une utilisation du capteur de cadavérine en milieu biologique « humide », mais devra être confirmé par une étude de l'effet d'interférence de l'eau. Une première estimation de la limite de détection de la cadavérine en solution dans l'acétonitrile serait de 250 ppb.

L'étude en solution a été déterminante pour le choix des précurseurs alcoxysilanes dans la préparation de matrice poreuse hydrophobes. Un précurseur phénylé du type Ph-Si-(OMe)₃ a été choisi afin de rendre la surface des pores hydrophobes et de limiter le nombre de groupements Si-OH résiduels. Par manque de temps, ces matrices n'ont pas été exposées aux vapeurs de cadavérine. Ces études d'exposition devront être poursuivies, notamment en milieu très humide où la vapeur d'eau se trouve à une concentration aussi élevée que 25000 ppm.

Chapitre 4 : Détection de COV exogènes

I. Concept de COV exogène	135
<i>I.1. Utilisation de substrats enzymatiques</i>	135
<i>I.2. Utilisation de substrats osmogènes</i>	138
I.2.1. Etat de l'art	138
I.2.2. Approche suivie pour la détection de bactéries	140
II. Mise en évidence de l'activité β-glucuronidase : détection du p-nitrophénol.....	142
<i>II.1. Propriétés du p-nitrophénol (pNP)</i>	142
<i>II.2. Synthèse de monolithes pour la détection du p-nitrophénol</i>	144
II.2.1. Synthèse de monolithes contenant de l'APTES, sans molécule sonde.....	144
II.2.2. Synthèse de monolithes contenant de l'APTES, dopés au pNP	145
II.2.3. Synthèse de monolithes avec des précurseurs hydrophobes	146
<i>II.3. Exposition de monolithes à du p-nitrophénol.....</i>	146
II.3.1. Monolithe en présence d'une goutte de solution éthanolique de pNP	147
<i>II.3.1. a exposition</i>	147
<i>II.3.1. b Etude du profil en concentration d'un monolithe.</i>	150
II.3.2. Monolithe en présence d'une goutte de solution aqueuse de pNP	151
II.3.3. Monolithe exposé à des pressions partielles de vapeurs saturantes de pNP dans une rampe à vide.....	153
II.3.4. Exposition à du pNP issu de l'hydrolyse enzymatique.....	156
<i>II.3.4.a Génération de pNP en milieu tamponné par le MOPS.....</i>	157
<i>II.3.4.b Génération de pNP en milieu tamponné par le MES.....</i>	160
III. Mise en évidence de l'activité arylamidase : détection de la β-naphthylamine	164
<i>III.1. Détection colorimétrique de la β-naphthylamine (β-NA).....</i>	164
III.1.1. Etude de la réaction entre le DMACA et la β -NA en solution	164
III.1.2. Caractérisation du produit azo.....	167
III.1.3. Evaluation de la réaction du DMACA avec des interférents.....	168
III.1.4. Choix des souches pour la mise en évidence de l'activité L-alanine- β -naphthylamidase	170
III.1.5. Synthèse et caractérisation de monolithe dopés DMACA.....	171
III.1.6. Exposition de monolithes à la β -NA en phase gaz	173
<i>III.2. Détection en fluorescence de la β-naphthylamine.....</i>	175
III.2.1. Propriétés de la β -naphthylamine	175
III.2.2. Synthèse de monolithe et exposition à la β -naphthylamine	176
IV. Conclusion	177

I. Concept de COV exogène

Les méthodes de détection de bactéries doivent être très sensibles car les quantités de bactéries suffisant à provoquer une intoxication alimentaire sont très faibles (quelques dizaines de cfu). A ces concentrations de bactéries, celle des mCOV qu'elles émettent est de l'ordre de quelques centaines de ppb. [152] La détection de mVOC présente donc une limite qui correspond à la concentration de ces métabolites volatils. Pour pallier cette limitation, nous proposons une autre approche qui est de détecter des COV dits exogènes, issus de la dégradation de substrats volontairement introduits dans les milieux de culture. Lorsque ces substrats enzymatiques, appelés substrats osmogènes (du grec « osme » qui signifie odeur), sont décomposés sous l'action d'enzymes, des composés volatils (organiques ou non) sont libérés. Ces composés sont choisis pour leurs propriétés optiques (forte absorption ou fluorescence), physicochimiques (constante de Henry, pKa, solubilité) et chimique (réactivité vis-à-vis de molécules sondes éventuelles).

I.1. Utilisation de substrats enzymatiques

Les substrats enzymatiques sont utilisés en microbiologie depuis les années 1940. [98] Leur introduction dans des milieux de culture sélectifs permet de réaliser dans un même temps l'isolement et l'identification, et ce, en 24 heures. Leur particularité vient du fait que seuls les micro-organismes possédant l'enzyme pour lyser le substrat enzymatique sont capables de libérer un composé absorbant, fluorescent, luminescent ou chromogène précipitant, témoin de l'action de l'enzyme. L'hydrolyse du substrat enzymatique a lieu à l'intérieur du micro-organisme, lieu de production des enzymes. Les composés absorbant, fluorescent et luminescent, une fois libérés, peuvent traverser la paroi de la cellule et diffuser dans le milieu de culture. Une fois libérés, les composés chromogènes précipitant forment instantanément un solide au sein même de la cellule. Selon le substrat enzymatique utilisé, la présence d'enzyme est révélée par la modification d'absorption, de fluorescence ou de luminescence dans le milieu de culture ou par la coloration des colonies.

La Figure 91 compare l'utilisation de méthodes traditionnelles à l'utilisation de substrats enzymatiques. Afin d'isoler une colonie dont la taxonomie est inconnue, les méthodes traditionnelles font appel à différents milieux d'enrichissement sélectif qui sont inoculés avec l'échantillon (Phase 1). Cette première phase dure environ 24 heures et nécessite l'utilisation de plusieurs milieux sélectifs. Les colonies isolées subissent ensuite un test d'identification biochimique, type galerie API, afin de déterminer la souche de bactérie mise en évidence (Phase 2). Cette seconde phase dure 24 heures. Pour confirmer les résultats des tests d'identification biochimiques, 3 galeries API doivent être inoculées par colonie. Le nombre de tests à effectuer est d'autant plus grand qu'il y a de colonies différentes isolées. Les méthodes traditionnelles requièrent donc l'utilisation de beaucoup de consommables (milieux sélectifs, tests d'identification) pour livrer un résultat en deux jours.

L'incorporation de substrats enzymatiques dans les milieux de culture apporte un réel avantage à la détection et l'identification de micro-organismes. En une seule étape de 24 heures, et avec un seul milieu de culture contenant différents substrats enzymatiques, les souches sont identifiées. Des économies sont réalisées à la fois sur les consommables et sur le temps de travail. [9]

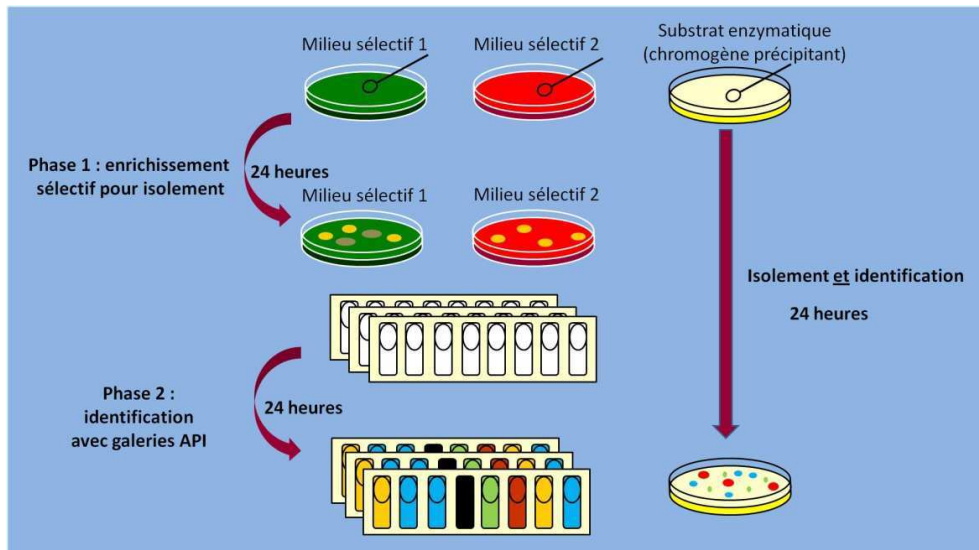


Figure 91 : Comparaison entre l'utilisation de substrats enzymatiques, ici chromogènes précipitant, et les méthodes traditionnelles pour l'isolement et l'identification d'un micro-organisme.

Ainsi, des substrats synthétiques chromogènes, fluorogènes, luminogènes et chromogènes précipitants ont été mis au point pour identifier des bactéries en milieu liquide et gélosé. Les bactéries produisant l'enzyme appropriée dégradent le substrat entraînant la libération de composés chromophores, fluorophores ou luminophores dans le milieu (Figure 92). Dans ce chapitre, seules les enzymes appartenant à la classe des hydrolases (répertoriées EC 3) seront abordées. Il s'agit d'enzymes qui catalysent les réactions d'hydrolyse comme par exemple les estérases, peptidases, glucosidases, phosphatases...

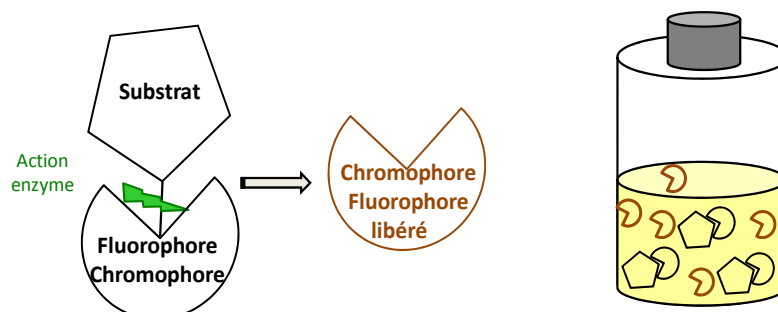


Figure 92 : Représentation schématique d'un substrat enzymatique. Sous l'action d'enzyme, la liaison covalente entre le composé chromophore/fluorophore et le substrat est rompue. Le composé chromophore/fluorophore ainsi libéré peut être détecté dans le milieu de culture.

Par exemple, le substrat 4-méthylumbelliferyl- β -D-glucuronide libère un composé fluorescent, la 4-méthylumbelliférone, sous l'action d'enzyme glucuronidase ; ou encore, le

substrat 5-bromo-4-chloro-3-indoxyl phosphate, dégradé par des enzymes phosphatases, libère le chromogène précipitant indoxyl qui provoque une coloration bleue des colonies (Tableau 20). [98,275,276] Les enzymes sucrases, estérases, phosphatases, lipases libèrent les métabolites liés à des substrats par leur fonction hydroxyle. Les enzymes peptidases libèrent les métabolites liés à des substrats par leur fonction amine.

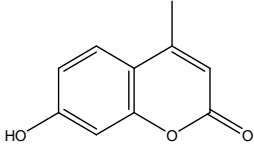
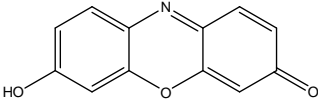
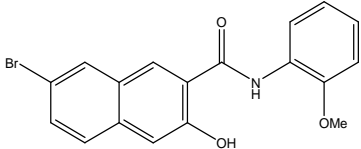
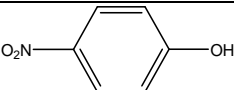
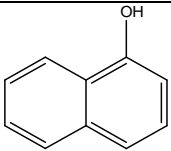
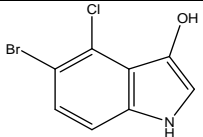
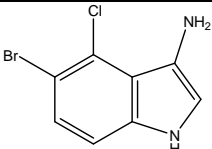
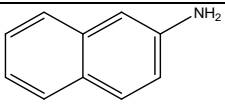
Activité enzymatique	Exemple de métabolite libéré	Signal observé
Sucrases, estérases, phosphatases, lipases	 4-umbelliféron	Fluorescence
	 Résorufine	Fluorescence
	 Naphthol AS-BI	Fluorescence
	 <i>p</i> -nitrophénol	Absorption
	 α-naphthol	Absorption
	 5-bromo-4-chloro-3-hydroxy-indole	Absorption
Peptidase	 5-bromo-4-chloro-3-amido-indole	Absorption
	 β-naphthylamine	Fluorescence

Tableau 20 : Exemples de substrats chromogènes, fluorogènes et chromogènes précipitants. [98,277]

I.2. Utilisation de substrats osmogènes

I.2.1. Etat de l'art

La détection en phase gazeuse de métabolites gazeux issus de la dégradation d'un substrat enzymatique volontairement introduit dans un milieu de culture a déjà été employée par plusieurs auteurs. Cette démarche est illustrée sur la Figure 93.

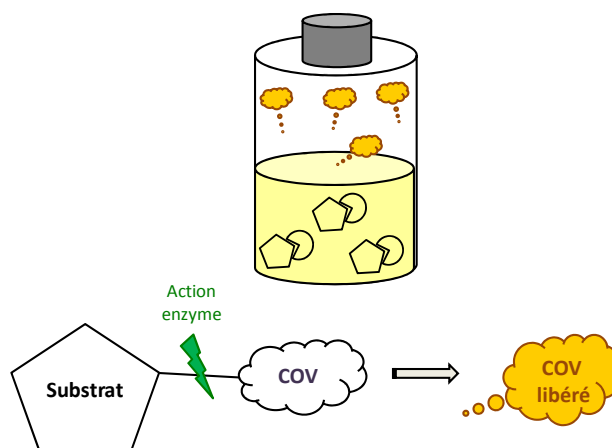


Figure 93 : Représentation schématique d'un substrat osmogène. Sous l'action d'enzyme, la liaison covalente entre le composé chromophore/fluorophore et le substrat est rompue. Le composé chromophore/fluorophore ainsi libéré peut être détecté dans la phase gazeuse au-dessus du milieu de culture.

En 1972, la société Waters protège l'idée d'introduire un substrat marqué au carbone ^{14}C dans un milieu de culture. [278] En présence de micro-organismes, la décarboxylation d'acides aminés radiomarqués, du $^{14}\text{CO}_2$ formé est détecté dans la phase gazeuse par scintigraphie. Pleura *et al.* s'inspirent de cette méthode radiométrique pour la détection, dans l'haleine, de présence d'*Helicobacter pylori* dans l'estomac de patients. [279] Une capsule d'urée marquée ^{14}C est ingérée par le patient. La présence d'uréase dans l'estomac étant indissociable de la présence d'*Helicobacter pylori*, la détection des produits de dégradation d'urée marquée ^{14}C (ammoniac et $^{14}\text{CO}_2$) témoigne de l'existence du micro-organisme dans la flore intestinale du patient. Les auteurs détectent le $^{14}\text{CO}_2$ en faisant souffler le patient à travers une paille plongée dans une solution d'hydroxyde d'hyamine (hydroxyde d'ammonium quaternaire de diméthyl-benzyl-alkyl en C12-16 à 1 M dans l'éthanol) permettant une analyse par scintigraphie. Bien qu'intéressante, cette méthode a dû affronter les réticences des patients appréhendant l'idée d'ingérer des composés radiomarqués. De plus, elle nécessite l'investissement dans un compteur à scintillation pour la détection de $^{14}\text{CO}_2$. [280]

Suslick *et al.* ont récemment exploité l'activité uréase d'*Helicobacter pylori* en faisant aussi ingérer aux patients une pastille d'urée. Cette fois-ci, c'est l'ammoniac, produit de dégradation de l'urée par l'uréase, qui est détectée dans l'haleine du patient grâce à un réseau de capteurs colorimétriques. [281] Cette méthode présente l'avantage de travailler avec de l'urée non radiomarquée. Snyder *et al.* ont mis en évidence la présence

d'*Escherichia coli* dans un échantillon en ajoutant un substrat o-nitrophényl-β-D-galactopyranoside au milieu de culture. Sous l'action de l'enzyme β-galactosidase produite par *Escherichia coli*, le composé o-nitrophénol est libéré et détecté dans la phase gazeuse par spectrométrie de mobilité ionique (IMS, Ion Mass Spectrometry). [282]

La détection dans la phase gazeuse du métabolite issu de l'hydrolyse enzymatique est particulièrement intéressante, voire indispensable, lorsque le milieu de culture présente des propriétés optiques défavorables à l'emploi des substrats chromogènes, luminogènes ou fluorogènes. C'est le cas des milieux fortement colorés, fortement diffusants, ou présentant de la fluorescence intrinsèque. L'hémoculture est un exemple (milieu très diffusant, très absorbant et fluorescent). L'étude de la phase gazeuse en hémoculture (culture du sang) pour la détection de pathogène n'est pas nouvelle. Divers automates comme le Bactec 460 ou l'ESP (Tableau 21) ont déjà été mis au point afin d'accélérer le temps de réponse (10-18 heures). En effet, les tests conventionnels consistant à diluer un prélèvement de sang dans un milieu nutritif, à l'incuber à 37°C en étuve rotative et à vérifier régulièrement s'il se trouble ou non (un trouble correspond à la présence d'une suspension de bactéries) est chronophage (47 heures) et peu fiable. [283]

Système	Fabricant	Composé détecté...	... dans la phase :	détection	Description de la technologie
Bactec 460 [278]	Becton Dickinson (années 70)	CO ₂	gaz	invasive	Incorporation de substrats carbonés marqué ¹⁴ C puis détection par respirométrie radiométrique (quantification du ¹⁴ CO ₂ par émission β à 156 keV)
Bactec 660/730/860 [284]	Becton Dickinson (1985)	CO ₂	gaz	invasive	Spectroscopie d'absorption infra-rouge
Bio-Argos [285]	Bio-Rad (1989)	CO ₂	gaz	non invasive	Spectroscopie d'absorption infra-rouge
BacT/Alert [286]	Organon Teknika (1989)	CO ₂	liquide	non invasive	Transduction optique (sonde chromogène de pH dans une matrice polymère perméable aux gaz)
Vital [287]	bioMérieux (1993)	CO ₂	liquide	non invasive	Transduction optique (sonde fluorescente de pH solubilisée dans le milieu de culture)
Bactec 9240 [288]	Becton Dickinson (1993)	CO ₂	liquide	non invasive	Transduction optique (sonde fluorescente de pH dans une matrice polymère perméable aux gaz)
OASIS [289]	Unipath (1994)	L'ensemble des COV	gaz	non invasive	Suivi manométrique
ESP [290]	Difco (1992)	L'ensemble des COV	gaz	non invasive	Suivi manométrique
Bactec LX [291]	Becton Dickinson (2006)	CO ₂	gaz	non invasive	Spectroscopie d'absorption infra-rouge

Tableau 21 : Récapitulatif des automates d'hémoculture mis sur le marché depuis les années 70.

En temps normal, le sang est maintenu stérile par le système immunitaire (lymphocytes). Une bactériémie est définie comme la présence éphémère ou chronique de pathogènes dans le sang sans foyer infectieux de départ et sans trouble clinique. Au contraire, la septicémie correspond l'infection généralisée du sang due à l'émission massive et répétée d'agents pathogènes issus d'un foyer septique. [292,293] Il est difficile de détecter une bactériémie ou une septicémie car la concentration en pathogènes est très faible. De plus, une grande variété de pathogènes peut être à l'origine d'une bactériémie ou d'une septicémie. La mise en culture d'un échantillon de sang est donc indispensable pour augmenter la population de pathogène. Cette étape est rendue difficile par la présence de lymphocytes et de traces d'antibiotiques qui ralentissent la croissance des micro-organismes.

A l'heure actuelle, en plus de la détection, la recherche s'oriente vers une identification par analyse des phases gazeuses des flacons d'hémoculture avec des nez électroniques. [294,299]

Les substrats pour hydrolases sont généralement préparés par addition (formation d'une liaison covalente) d'un chromophore ou d'un fluorophore sur la fonction hydroxyle ou amine d'un nutriment (acide carboxylique, sucre, phosphate) nommé substrat. Si nécessaire, les autres fonctions présentes sur le substrat seront fonctionnalisées pour empêcher l'occurrence d'une activité enzymatique en ces endroits. Le chromophore ou fluorophore est choisi de façon à ce qu'il ne puisse pas être dégradé par des enzymes mais seulement clivé du substrat par ces dernières. [295] En d'autres termes, le substrat doit être « reconnu » par l'enzyme visée au même titre qu'un nutriment non modifié.

Cette approche présente l'avantage d'être générique et de pouvoir s'appliquer à tout type de substrat et de COV, à condition qu'ils présentent tous deux des fonctions chimiques pouvant réagir entre elles. Cette approche peut tout aussi bien être utilisée pour la mise en évidence d'une enzyme précise via l'introduction d'un substrat unique judicieusement choisi, qu'être employée pour détecter toute activité microbienne dans un milieu stérile tel que le sang. Pour ce faire, différents substrats osmogènes seraient ajoutés à l'échantillon sanguin. Ils devraient libérer le même COV et cibler des activités enzymatiques les moins spécifiques possibles. L'objectif étant de détecter tout pathogène éventuellement présent, ces substrats sont incorporés afin d'augmenter les chances de voir au moins une des enzymes produites par le pathogène dégrader un des substrats, permettant ainsi la détection de COV.

I.2.2. Approche suivie pour la détection de bactéries

Comme présenté dans l'introduction (Chapitre 1), un troisième capteur pour la mise en évidence de la présence de *Salmonella* est envisagé. Il s'agirait d'utiliser un substrat osmogène faisant appel à l'enzyme **C8-estérase**, enzyme caractéristique de *Salmonella*. [98] Cependant, notre laboratoire n'est pas adapté pour la manipulation de bactéries pathogènes comme *Salmonella*. De plus, nous connaissons peu la voie enzymatique C8-estérase.

Nous proposons alors, dans ce chapitre, de réaliser une preuve du concept de la détection de mCOV osmogènes avec des bactéries modèles dont la souche est non pathogène et peut donc être manipulée sans danger. Nous nous orientons alors vers *Escherichia coli* dont l'activité enzymatique caractéristique est l'**activité β -glucuronidase**. Le substrat choisi pour la mise en évidence cette activité est le 4-nitrophényl- β -D-glucuronide qui libère un mCOV possédant une fonction hydroxyle, le p-nitrophénol (noté pNP).

E. coli est une bactérie à Gram négatif. Selon certains auteurs, l'activité L-alanine-aminopeptidases est caractéristique des bactéries à Gram négatif. [296,297] Nous proposons alors d'illustrer le concept de mCOV osmogènes avec un deuxième exemple : la mise en évidence de l'**activité L-alanine- β -naphthylamidase**. Le substrat choisi pour la mise en évidence cette activité est le L-alanine- β -naphthylamide qui libère un mCOV possédant une fonction amine, la β -naphthylamine (notée β -NA).

Notre approche consiste à détecter dans la phase gazeuse les métabolites issus de la dégradation de substrats (Figure 93). Notre originalité, qui a été protégée par un brevet, [298] privilégie la transduction optique directe pour cette détection.

Les substrats osmogènes et les mCOV exogènes pertinents pour une détection optique, et en phase gaz, doivent posséder les propriétés décrites dans le Tableau 22. [299]

Substrat osmogène	COV exogène issu du substrat osmogène
<ul style="list-style-type: none"> – Etre soluble dans l'eau – Pouvoir être reconnu par l'enzyme cible – Présenter une cinétique rapide de lyse du substrat – Absence (ou lenteur) d'hydrolyse spontanée du substrat 	<ul style="list-style-type: none"> – Forte constante de Henry (forte volatilité, faible solubilité dans l'eau) – Faible affinité pour le milieu de culture – Faible solubilité dans l'eau – Propriétés optiques intéressantes (forte absorption ou forte fluorescence) <p style="text-align: center;">ou</p> <ul style="list-style-type: none"> – Capacité à réagir avec une molécule sonde pour former un produit fortement absorbant ou fluorescent

Tableau 22 : Description des propriétés requises pour le substrat osmogène et le COV exogène dans le cas d'une détection en phase gazeuse de la présence d'enzyme capable de dégrader le substrat osmogène synthétique. [299]

Le p-nitrophénol, composé coloré, est détecté en absorption lorsqu'il est piégé dans une matrice poreuse sans sonde. De même, la fluorimétrie peut être utilisée pour détecter la β -naphthylamine, composé fluorescent, lorsqu'elle est piégée dans une matrice sans sonde. Lorsque la matrice poreuse est dopée avec une molécule sonde, le paradiméthylaminocinnamaldéhyde (DMACA), le produit coloré issu de sa réaction avec la β -naphthylamine est détecté en colorimétrie (Tableau 23).

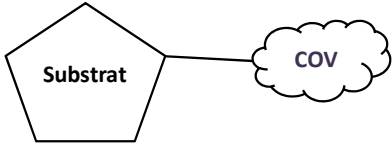

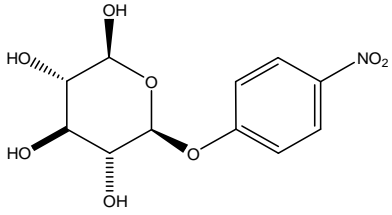
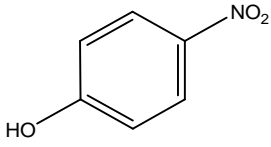
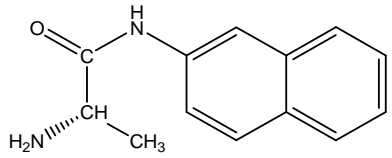
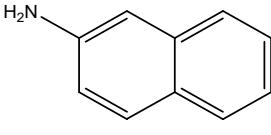
Fonction reliant le mCOV au nutriment	Substrat osmogène	COV exogène	Type de détection optique
			
Hydroxyle (-OH)	4-nitrophényl-β-D-glucuronide 	pNP 	✓ Absorption (sans molécule sonde)
Amine (-NH ₂)	L-alanine-β-naphthylamide 	β-naphthylamine 	✓ Absorption (avec molécule sonde, le DMACA) ✓ Fluorescence (sans molécule sonde)

Tableau 23 : Substrats osmogènes étudiés au cours du chapitre 4.

II. Mise en évidence de l'activité β-glucuronidase : détection du p-nitrophénol

L'activité β-glucuronidase, présente chez *E. coli*, [98] est mise en évidence grâce au substrat 4-nitrophényl-β-D-glucuronide capable de libérer du p-nitrophénol. Ce composé est absorbant. Ses propriétés optiques sont suffisamment intéressantes pour ne pas nécessiter de réaction de couplage avec une molécule sonde. La matrice nanoporeuse préparée par voie sol-gel pour la détection ne contient pas de molécule sonde. Des monolithes sans sonde ont donc été préparés puis testés en présence de vapeurs de p-nitrophénol avant d'être exposés à des atmosphères de cultures bactériennes.

II.1. Propriétés du p-nitrophénol (pNP)

Le p-nitrophénol noté pNP est une molécule aromatique contenant un noyau phénolique et un substituant nitro. Elle possède une forme acide et une forme basique qui absorbent à deux longueurs d'onde différentes, respectivement 318 nm et 401 nm (Figure 94). [300] Son pKa est de 7,15. [300] L'équilibre entre ces deux formes se traduit par la présence d'un point isobestique à 346 nm. La forme acide, notée pNP, est jaune pâle tandis que la forme basique, notée pNP⁻, est jaune très intense. Le passage à la forme phénolate du pNP a un effet bathochrome (décalage vers les grandes longueurs d'onde) et un effet hyperchrome (augmentation du coefficient d'extinction molaire).

La forme acide absorbe à une faible longueur d'onde (317 nm) et son coefficient d'extinction molaire est plus faible et vaut $\epsilon_{317\text{nm}} = 8\,300 \pm 410 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ($\epsilon_{318\text{nm}} = 9\,000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ d'après la littérature [300]). A 317 nm, la matrice silicate absorbe modérément ($DO_{317\text{nm}} \approx 0,15$) ce qui pourrait être gênant dans le cas de la détection de faibles concentrations de pNP. On lui préférera la détection de la forme basique à 400 nm car elle présente un coefficient d'extinction molaire élevé de $\epsilon_{400\text{nm}} = 18\,000 \pm 880 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ($\epsilon_{401\text{nm}} = 19\,000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ d'après la littérature [300]). Aucune des deux formes du p-nitrophénol n'est fluorescente et par conséquent, une détection en fluorescence ne peut pas être envisagée. [301]

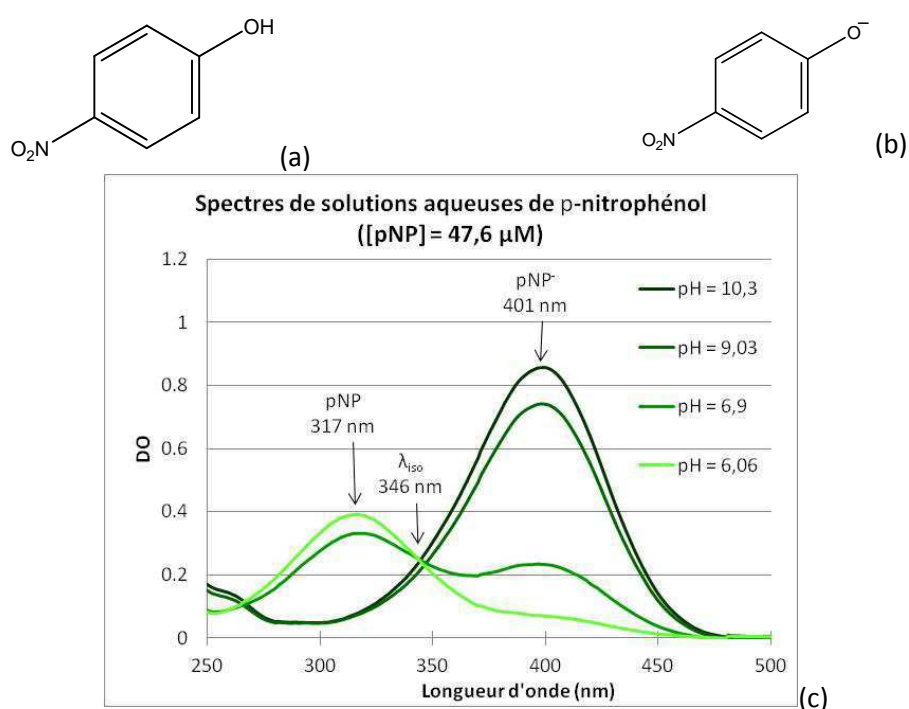


Figure 94. (a) Structure du p-nitrophénol noté pNP sous forme acide ; (b) Structure du p-nitrophénol sous forme basique noté pNP⁻ ; (c) Spectres d'absorption du p-nitrophénol à différents pH, l'équilibre entre les deux formes du pNP se traduit par la présence d'un point isobestique à 346 nm.

Le pNP est très peu soluble dans l'eau (0,6 mg/mL) et un peu plus soluble dans l'éthanol (6 mg/mL). Les valeurs des constantes de Henry H_{cc} (Annexe 4) déterminées dans la littérature sont faibles (Tableau 24) c'est-à-dire que le p-nitrophénol est peu volatil. La valeur de constante de Henry retenue pour les calculs car nous semblant la plus fiable, est $H_{cc} = 4,13 \cdot 10^{-5}$.

p-nitrophénol (pNP)	$C_6H_5NO_3$	$1,57 \cdot 10^{-8}$
		$4,13 \cdot 10^{-5}$
		$1,36 \cdot 10^{-6}$
		$5,11 \cdot 10^{-7}$

Tableau 24 : Valeurs de constantes de Henry H_{cc} (sans dimension) du pNP relevées dans la littérature. [302]

II.2. Synthèse de monolithes pour la détection du p-nitrophénol

Les protocoles utilisés pour la synthèse de sol-gel sont décrits en Annexe 9.2.

II.2.1. Synthèse de monolithes contenant de l'APTES, sans molécule sonde

Le p-nitrophénol possède des propriétés optiques intéressantes et peut être détecté lorsqu'il est piégé dans une matrice nanoporeuse ne contenant pas de sonde. Le p-nitrophénol est une molécule plus grosse que le sulfure d'hydrogène. Par conséquent, il n'est pas possible d'utiliser le même protocole de synthèse que pour les matrices acides dopées à la DMPD (Chapitre 2). De plus, il serait intéressant d'avoir une matrice présentant des fonctions basiques afin de détecter le p-nitrophénol sous sa forme la plus absorbante c'est-à-dire pNP^- . Un précurseur possédant une fonction aminopropyle (3-aminopropyltriéthoxysilane, APTES) est donc introduit à différentes concentrations par rapport au tétraméthylorthosilicate (TMOS) dans le sol de rapport molaire : (TMOS+APTES)/méthanol/eau : 1/5/4 (Tableau 25).

Nom de la formule	APTES_3%	APTES_6%	APTES_8%	APTES_10%
Ratio molaire du sol TMOS/APTES/MeOH/eau	0,97/0,03/5/4	0,94/0,06/5/4	0,92/0,08/5/4	0,9/0,1/5/4
Angle de goutte	48,6°	17,6°	16,5°	14,6°

Tableau 25 : Formules de sol et propriétés de mouillage des monolithes contenant des fonctions aminopropyle.

Ce précurseur alkoxyté, via sa fonction aminopropyle, entraîne un agrandissement de la taille des pores du fait de son encombrement stérique. Les paramètres de porosité d'un monolithe obtenu par incorporation de 3% d'APTES dans le sol sont analysés en établissant l'isotherme d'adsorption-désorption d'azote à basse température (Annexe 10.2). La distribution de tailles des pores est centrée autour de 50 Å et le monolithe présente une surface spécifique de $1000 \pm 200 \text{ m}^2/\text{g}$. Lorsque la concentration d'APTES est augmentée jusqu'à atteindre 10%, la surface spécifique d'adsorption diminue ($800 \pm 200 \text{ m}^2/\text{g}$) et la répartition des pores évolue vers une diminution de la taille des pores avec 2 populations de pores centrées autour de ~ 30 et 49 Å. Pendant l'étape de séchage des monolithes, ces derniers deviennent opaques. Un séchage prolongé sous flux d'azote sec permet d'obtenir des monolithes à nouveau transparents (Figure 95). De même, l'hydratation complète d'un monolithe permet de retrouver sa transparence. Ce phénomène est dû à la diffusion de la lumière dans les monolithes en fonction de l'indice de réfraction de celui-ci, qui varie au cours du séchage ou de l'hydratation du monolithe. [303]

La présence de fonctions amine modifie les propriétés de mouillage des monolithes. Plus ils contiennent de fonctions aminopropyle, plus ils présenteront une affinité pour l'eau et donc, un faible angle de mouillage (Tableau 25).

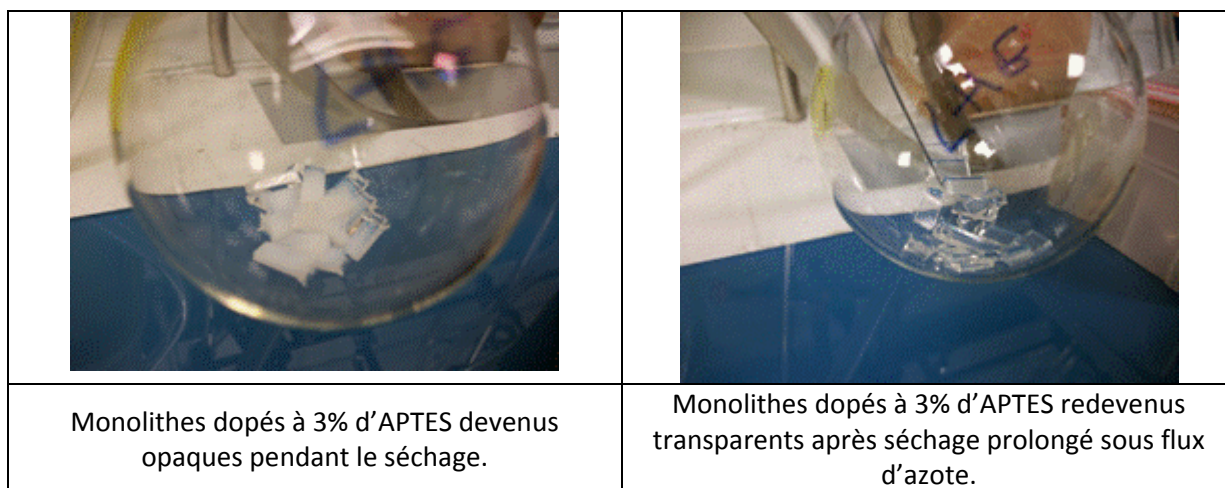


Figure 95 : Photos des monolithes sol-gel dopés à l'APTES passant par une étape opaque lors du séchage.

II.2.2. Synthèse de monolithes contenant de l'APTES, dopés au pNP

Des monolithes dopés à différentes concentrations de p-nitrophénol (10 μ M à 10 mM) sont préparés afin de déterminer le coefficient d'extinction molaire du pNP dans la matrice (Figure 96).

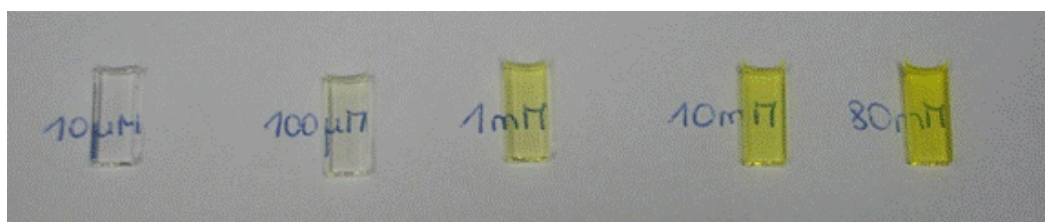


Figure 96 : Photo des monolithes dopés pNP.

D'après la photo de la Figure 96, un gradient de concentration en pNP existe pour le monolithe dopé avec 100 μ M de pNP. Le spectre d'absorption de ce monolithe a été acquis en trois points différents selon la hauteur du monolithe et montre que l'intensité de la DO varie le long du monolithe (les données ne sont pas montrées). Cette observation laisse entrevoir une inhomogénéité de la répartition du pNP dans le monolithe. Elle s'est certainement produite lors du séchage. En s'évaporant, le solvant entraîne avec lui le pNP qui s'accumule dans la partie supérieure du monolithe. Le pNP étant volatile et non lié de façon covalente à la matrice sol-gel, il est possible qu'une faible quantité en surface se soit volatilisée. L'observation d'un palissement progressif de la couleur jaune des monolithes pendant leur vieillissement vient confirmer cette hypothèse. Il ne sera donc pas possible de déterminer le coefficient d'extinction molaire du pNP en monolithe par incorporation de pNP dans le sol.

II.2.3. Synthèse de monolithes avec des précurseurs hydrophobes

Les monolithes sont destinés à être utilisés dans des milieux biologiques donc présentant une humidité relative importante. L'eau sous forme gazeuse peut s'adsorber à la surface des pores des monolithes, d'autant plus que les fonctions aminopropyle hydrophiles favorisent ce phénomène. L'eau peut donc être considérée comme un interférent dans le sens où elle peut s'adsorber préférentiellement par rapport au pNP dans le monolithe.

Afin d'éviter ce phénomène, des précurseurs hydrophobes, contenant des chaînes polyéthylène glycol, sont incorporés à hauteur de 3% par rapport au TMOS dans un sol de ratio molaire TMOS/MeOH/eau : 1/5/4 (Tableau 26). La longueur des chaînes PEG provoque un encombrement stérique qui permet d'obtenir des pores de grande taille.

Nom du précurseur	2-[méthoxy (polyéthylèneoxy) propyl]-tri méthoxysilane 6-9 répétitions PEG	3-méthoxypropyl triméthoxysilane	2-[méthoxy (polyéthylèneoxy) propyl]-tri méthoxysilane 9-12 répétitions PEG
Nom de la formule	PEG_6-9	PEG_1	PEG_9-12
Structure	$\text{CH}_3\text{-O-(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_{6-9}\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-Si(OMe)}_3$	$\text{CH}_3\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-Si(OMe)}_3$	$\text{CH}_3\text{-O-(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_{9-12}\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-Si(OMe)}_3$
N° CAS	[65994-07-2]	[33580-59-5]	[65994-07-2]

Tableau 26 : Structures des précurseurs alcoxydes de silicium contenant différentes longueur de chaînes polyéthylène glycol.

II.3. Exposition de monolithes à du p-nitrophénol

Une étude est réalisée afin de mettre à l'épreuve la capacité des matrices à piéger du p-nitrophénol présent en phase gazeuse. Quatre expériences types sont mises au point.

- Un monolithe est mis en présence d'une goutte de p-nitrophénol dans une solution éthanolique déposée sur un matériau chauffé à 60°C pour que le p-nitrophénol s'évapore dans la phase gazeuse. [304] L'hypothèse que l'éthanol ne joue pas le rôle d'interférent est posée.

- Un monolithe est mis en présence d'une goutte de p-nitrophénol en solution dans l'eau. Le monolithe n'est pas en contact direct avec la solution si bien que l'unique interaction entre le monolithe et la cible se déroule en phase gaz, en présence d'humidité selon la loi de Henry.

- Un monolithe est placé dans une rampe à vide en présence de vapeurs saturantes formées à partir de p-nitrophénol solide sublimé. L'interaction entre le monolithe et la cible se déroule en phase gaz, en absence d'humidité.

- Un monolithe est placé au-dessus d'une culture de bactéries contenant un substrat pouvant libérer le p-nitrophénol. L'interaction entre le monolithe et la cible se déroule en phase gaz, en présence d'humidité et d'éventuels autres métabolites volatils pouvant jouer

le rôle d'interférents. La loi de Henry permet de calculer la répartition du pNP entre la phase liquide et la phase gaz.

II.3.1. Monolithe en présence d'une goutte de solution éthanolique de pNP

II.3.1. a exposition

Les monolithes préparés avec différentes concentrations de précurseurs APTES et 3% de précurseurs PEG sont exposés dans des récipients en verre ($V = 98,6 \text{ mL}$) pendant 24 heures à une atmosphère de 107 ppm de pNP, générée à $t=0$ par évaporation totale d'une goutte de $10 \mu\text{L}$ de solution éthanolique à 44 mM en pNP (Figure 97, Annexe 11.2). Après 24 heures d'exposition, les monolithes ont tous piégé du pNP.

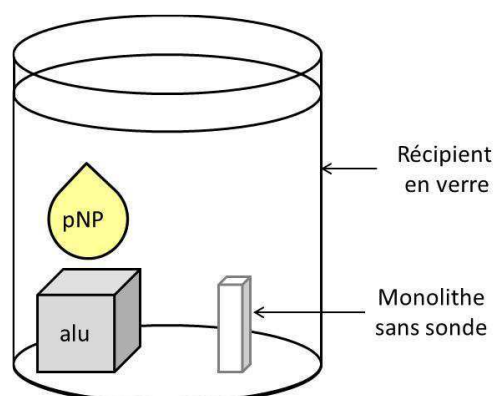


Figure 97 : Schéma du montage d'exposition d'un monolithe à du pNP par évaporation totale d'une solution éthanolique de pNP.

Les spectres d'absorption des monolithes contenant entre 6% et 10% d'APTES présentent un pic à 383 nm (Figure 98). Ce pic correspond à la forme basique du pNP qui subit un déplacement hypsochrome par rapport à son maximum d'absorption en solution aqueuse (401 nm). Cette observation est cohérente puisque la forme basique est favorisée dans les monolithes contenant le plus d'APTES, donc le plus de fonctions aminopropyle. En effet, le pK_a du pNP ($pK_{a,pNP} = 7,15$) est inférieur à celui de l'APTES dont le pK_a de la fonction n-propylamine vaut 10,53.

Le spectre du monolithe préparé avec 3% d'APTES présente les pics des deux formes du pNP : la forme basique qui absorbe à 383 nm et la forme acide qui absorbe à 321 nm (Figure 98). Ayant déterminé les coefficients d'extinction molaire des formes acide et basique du pNP en solution, et en supposant que leur valeur n'est pas profondément différentes dans les monolithes, il est possible d'évaluer la concentration en pNP piégé dans chaque monolithe en utilisant la loi de Beer-Lambert ($\epsilon_{pNP,sol,400nm} \approx \epsilon_{pNP,mono,383nm} \approx 18000 \pm 880 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ et $\epsilon_{pNP,sol,317nm} \approx \epsilon_{pNP,mono,321nm} \approx 8300 \pm 410 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$).

On observe que moins le monolithe contient d'APTES, plus il piège du pNP (Tableau 27). En effet, moins le monolithe contient d'APTES, moins il est hydrophile d'après les mesures d'angle de goutte (Tableau 25) ; l'interférence des molécules d'eau est alors plus faible. Cependant, une autre explication serait que lorsque la proportion d'APTES augmente, on observe à la fois une diminution de la surface spécifique d'adsorption et l'évolution de la

distribution des pores vers des tailles plus petites, ce qui défavoriserait le piégeage de pNP par rapport à de petites molécules comme l'eau.

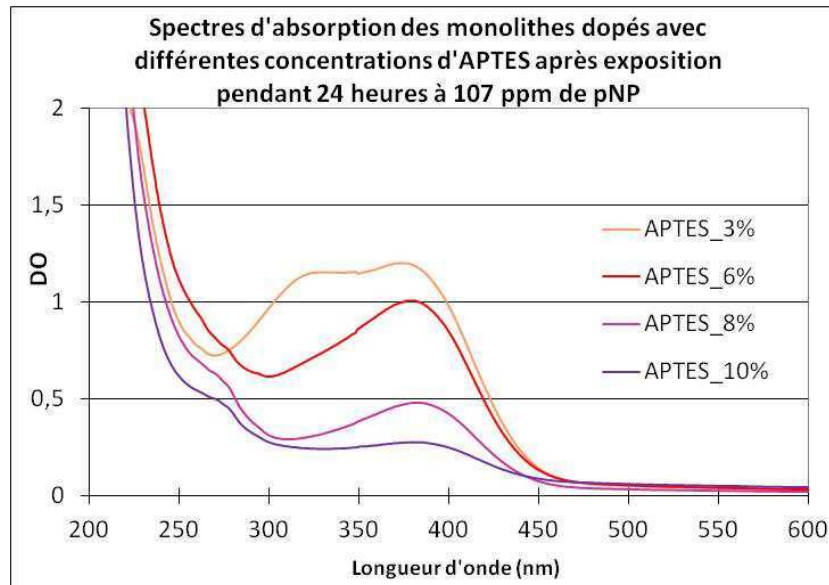


Figure 98 : Spectres d'absorption des monolithes préparés avec différentes concentrations de précurseur APTES et exposés pendant 24 heures à 107 ppm de pNP.

	APTES_3%		APTES_6%	APTES_8%	APTES_10%
DO max après déconvolution	A 321nm : 0,76	A 383 nm : 0,93	A 383 nm : 0,9	A 383 nm : 0,325	A 383 nm : 0,145
[pNP] en μM	458 μM	258 μM	250	90	40,3
Rendement de capture %	13,2		4,5	1,6	0,7

Tableau 27 : Estimation de la concentration en pNP capté au sein de monolithes dopés avec de l'APTES et exposés à 107 ppm de pNP pendant 24 heures. Le rendement de capture est calculé par rapport au nombre de mol de pNP présent dans la phase gazeuse ($n_{\text{pNP,tot}} = 10 \cdot 10^{-6}$; $0,044 = 440 \text{ nmol}$; $V_{\text{mono}} = 0,08 \text{ cm}^3$)

En, considérant que la quantité de molécules d'eau présentes au sein des pores est suffisante pour solvater les formes acide et basique du pNP qui s'y adsorbent, il est possible d'évaluer le pH intrapore à partir du spectre du monolithe dopé avec 3% d'APTES.

$$pH_{\text{pore}} = pKa + \log \frac{[pNP^-]_{\text{monolithe}}}{[pNP]_{\text{monolithe}}} = 7,15 + \log \frac{258}{458} = 6,90$$

Cette valeur est proche du pKa du pNP, ce qui est en accord avec l'observation de la présence simultanée des formes acide et basique du pNP.

Les spectres d'absorption des monolithes préparés avec des précurseurs contenant des fonctions polyéthylène glycol (PEG) présentent tous un pic d'absorption à 321 nm qui

correspond à la forme acide du pNP (Figure 99). En effet, ces monolithes ne contiennent pas de fonction amine qui pourrait modifier le pH intrapore et déplacer l'équilibre vers la forme basique.

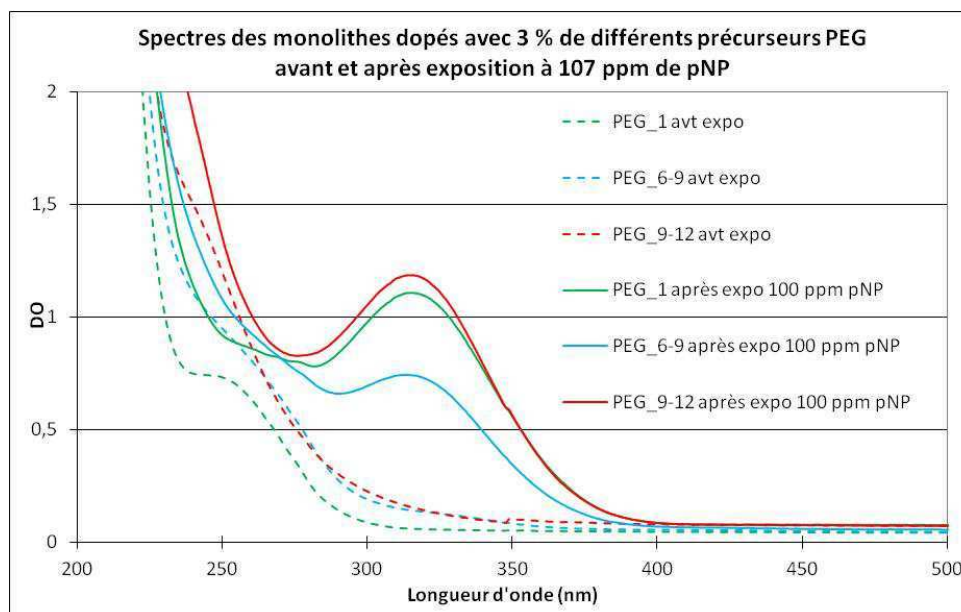


Figure 99 : Spectres d'absorption des monolithes préparés avec 3% de différents précurseurs PEG et exposés à 107 ppm de pNP pendant 24 heures. Epaisseur des monolithes = $2 \pm 0,1$ mm.

	PEG_1	PEG_6-9	PEG_9-12
DO max à 321 nm caprès déconvolution	0,7	0,425	0,85
[pNP] en μM	422	102,4	205
Rendement de capture %	7,7	1,8	3,6

Tableau 28 : Estimation de la concentration en pNP capté au sein de monolithes préparés avec 3% de différents précurseurs PEG exposés à 107 ppm de pNP pendant 24 heures. Le rendement de capture est calculé par rapport au nombre de mol de pNP présent dans la phase gazeuse ($n_{\text{pNP,tot}} = 10 \cdot 10^{-6} \cdot 0,044 = 440 \text{ nmol}$; $V_{\text{mono}} = 0,08 \text{ cm}^3$)

On s'attend à ce qu'une augmentation de la longueur de la chaîne polyéthylèneglycol entraîne une meilleure capture du pNP. C'est le cas pour le monolithe de formule PEG_9-12 qui capte plus de pNP que le monolithe de formule PEG_1 (Tableau 28). Pourtant le monolithe de formule PEG_6-9 préparé avec un précurseur possédant une longueur intermédiaire de PEG (6-9 unités PEG) capte moins bien le pNP que le monolithe de formule PEG_1.

Cette estimation n'est valable qu'en supposant que la concentration en pNP est homogène dans le monolithe. Cependant, l'observation des monolithes après exposition montre qu'il existe un gradient de concentration allant de la périphérie vers le centre du

monolithe. Une étude du profil de concentration selon la longueur et la largeur d'un monolithe est réalisée.

II.3.1. b Etude du profil en concentration d'un monolithe.

Cette étude consiste à acquérir la DO au maximum d'absorption de la molécule piégée (ici, 400 nm) en différents points d'un monolithe. Le montage présenté sur la Figure 100 a été mis au point pour cette étude. Il est composé d'une source lumineuse (lampe halogène-deutérium) dont le faisceau est amené en un point du monolithe grâce à une fibre optique. Une deuxième fibre optique récupère la lumière transmise qui est analysée avec un spectrophotomètre d'absorption portable (HR 2000+, Ocean Optics). Un bras muni d'une pince permet de déplacer le monolithe suivant la largeur ou la longueur du monolithe.

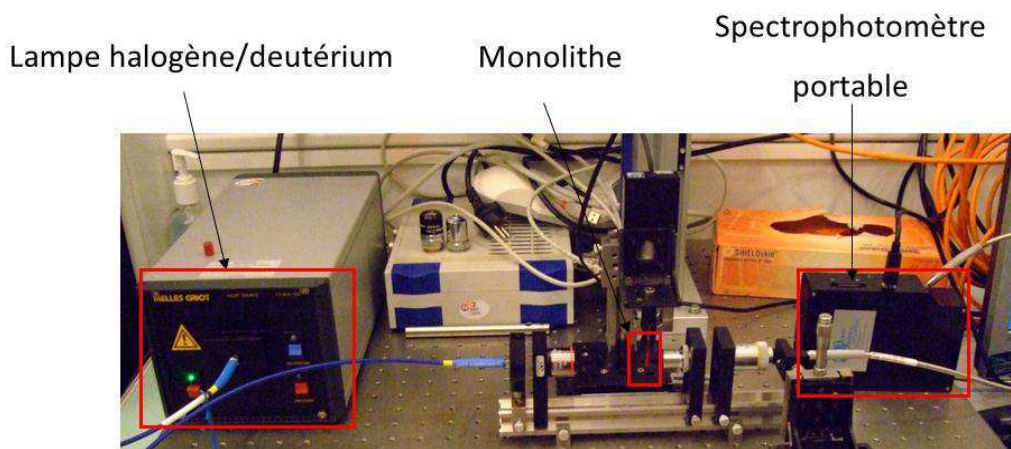


Figure 100 : Photo du montage permettant l'étude du profil de concentration d'un monolithe.

Le monolithe préparé avec 3% d'APTES et exposé à 107 ppm de pNP est étudié avec ce montage (Figure 101). Le profil de concentration vient confirmer ce qui peut être observé à l'œil nu : les bords du monolithe sont plus concentrés en pNP que le centre du monolithe. Etant donné que la source de pNP vient de l'extérieur du monolithe, cette observation est logique.

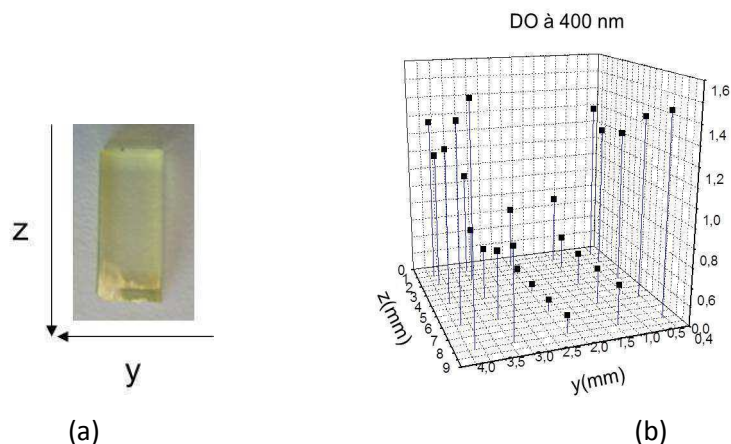


Figure 101 : (a) Photo du monolithe préparé avec 3% d'APTES, exposé à 107 ppm de pNP et étudié en profil de concentration ; (b) profil de concentration en pNP du monolithe.

En routine, l'acquisition des spectres d'absorption des monolithes est réalisée avec un spectrophotomètre. Un porte-monolithe usiné au laboratoire est utilisé à cet effet. Il permet d'acquérir le spectre sur la partie centrale du monolithe. L'étude du profil d'absorption vient mettre en évidence qu'avec le porte-monolithe, le spectre est acquis sur une zone du monolithe contenant moins de pNP.

Les concentrations de pNP en monolithe présentées au Tableau 28 sont calculées à partir du spectre d'absorption des monolithes acquis avec le porte-monolithe. Les valeurs sont donc sous-estimées.

Dans le cas de l'étude de monolithes préparés avec 3% de différents précurseurs PEG (Figure 99), la raison pour laquelle le postulat « plus la chaîne PEG est longue, mieux le pNP s'adsorbe à la surface des pores des monolithes » n'est pas vérifiée pour la formule PEG_6-9 est peut-être dû au mode d'acquisition du spectre d'absorption.

II.3.2. Monolithe en présence d'une goutte de solution aqueuse de pNP

Un monolithe est mis en présence de 200 μL d'une solution aqueuse de pNP 0,11 M à pH = 5,5 au sein d'une cuve fermée (Figure 102(a), Annexe 11.3). Lorsque l'équilibre s'établit entre le pNP en phase liquide et le pNP en phase gazeuse, l'utilisation de la constante de Henry du pNP permet de calculer la teneur en pNP dans la phase gazeuse.

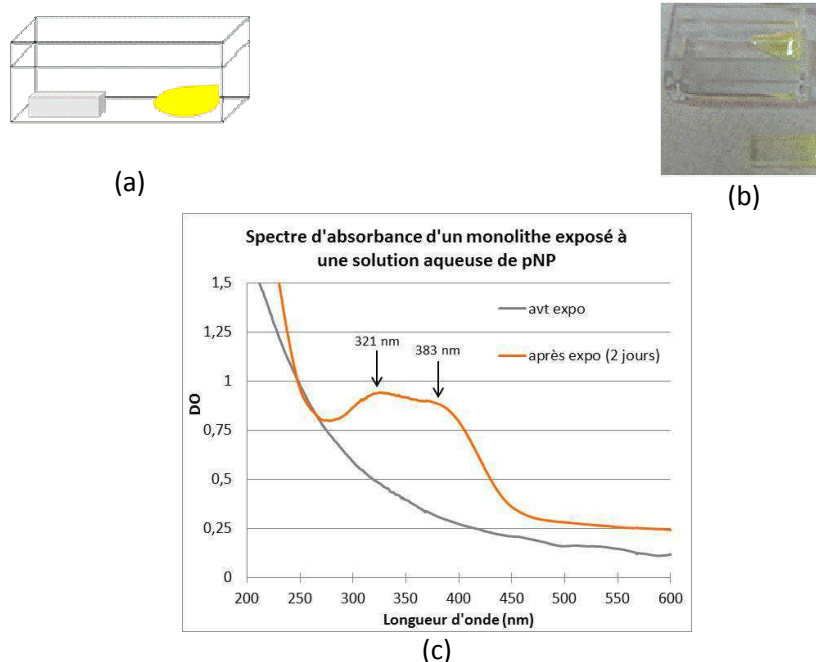


Figure 102 : (a) Représentation du montage mettant en présence une goutte de 200 μL de solution aqueuse de pNP 0,11 M et un monolithe dopé 3% APTES sans qu'il y ait contact entre eux ; (b) photo du montage en fin d'exposition : le monolithe présente un gradient de concentration ; (c) spectres d'absorption du monolithe avant et après exposition au pNP.

Le calcul présenté au Chapitre 2 est utilisé pour déterminer la teneur en pNP dans la phase gaz.

$H_{CC} = 4,13 \cdot 10^{-5}$; $V_{cuve} = 2,5 \text{ mL}$; $V_L = 200 \mu\text{L}$; $V_{mono} = 0,08 \text{ cm}^3$; V_m , le volume molaire à 20°C vaut $24 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$.

$$V_G = V_{cuve} - V_{mono} - V_L = 2,5 - 0,08 - 0,2 = 2,22 \text{ mL.}$$

Calculons x , la fraction molaire de pNP présente dans la phase gazeuse :

$$x = \frac{H_{CC} \frac{V_G}{V_L}}{1 + H_{CC} \frac{V_G}{V_L}} = \frac{4,13 \cdot 10^{-5} \frac{2,22}{0,2}}{1 + 4,13 \cdot 10^{-5} \frac{2,22}{0,2}} = 0,000458$$

$$\text{et } teneur = \frac{x \cdot n_{pNP, tot} \cdot V_m}{V_G} = \frac{0,000458 \cdot 2,2 \cdot 10^{-5} \cdot 24}{0,00222} = 109 \text{ ppm}$$

Le monolithe est exposé à 109 ppm de pNP. Après 2 jours, le monolithe est devenu jaune et on observe que la couleur est d'autant plus vive que le monolithe est proche de la goutte de solution (Figure 102(b)).

Le spectre du monolithe est acquis. Une bande large avec deux pics à 321 nm et 383 nm est observée. Les formes basique et acide du pNP absorbent aux mêmes longueurs d'onde que lorsque le pNP est introduit par évaporation d'une solution éthanolique (§II.3.1.).

Le gradient de coloration observé est suprenant car si l'atmosphère autour du monolithe est saturée en vapeur de pNP, on devrait observer un gradient de coloration allant de la périphérie du monolithe vers le centre de ce dernier. Au contraire, le gradient est observé depuis la face du monolithe la plus proche de la goutte de pNP jusqu'à la face la plus éloignée (Figure 103). Cette observation laisse à penser que le monolithe piège le pNP dès qu'il quitte la solution aqueuse. En d'autres termes, la cinétique d'adsorption du pNP dans le monolithe est plus rapide que la cinétique de diffusion du pNP(g) dans la phase gaz.

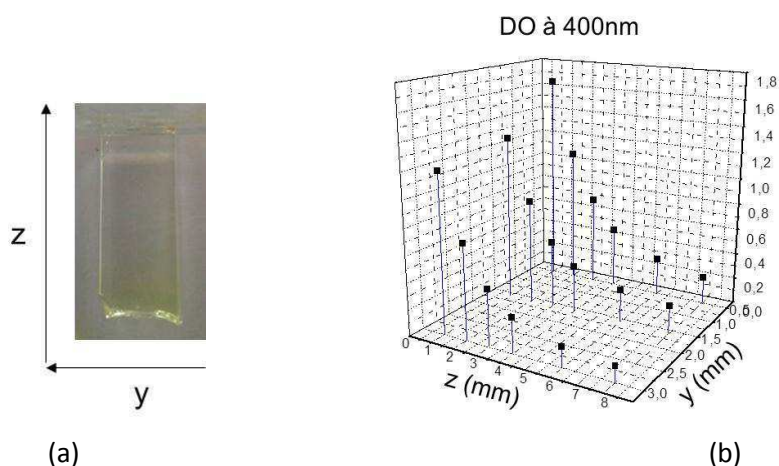


Figure 103 : (a) Photo du monolithe préparé avec 3% d'APTES, exposé à 200 μL de pNP à 0,11 M et étudié en profil de concentration ; (b) profil de concentration en pNP du monolithe.

La déconvolution du pic observé en Figure 102(c) permet d'évaluer la concentration en pNP et le rendement de capture (Tableau 29). La valeur obtenue (620%) confirme que le

système n'est pas à l'équilibre puisque le monolithe agit comme une éponge et déplace l'équilibre vers la volatilisation de pNP en phase gazeuse. Ainsi le capteur piège davantage de pNP volatilisé en phase gazeuse que la quantité calculée dans le cas d'un système à l'équilibre avec une teneur de 109 ppm.

	DO _{max} après déconvolution	[pNP]	Nombre de mol piégées	Rendement de capture
pNP à 321 nm	0,8	482 μM	39 nmol	$\frac{\sum n_{mono}}{x.n_{pNP,tot}} = \frac{39.10^{-9} + 23.10^{-9}}{0,000458.22.10^{-6}}$
pNP ⁻ à 383 nm	1,05	292 μM	23 nmol	$\frac{\sum n_{mono}}{x.n_{pNP,tot}} = \frac{62.10^{-9}}{10.10^{-9}} = 6,2$

Tableau 29 : Estimation de la concentration en pNP capté au sein du monolithe dopé avec 3% d'APTES et exposé à 109 ppm de pNP pendant 24 heures. Le rendement de capture est calculé par rapport au nombre de mol de pNP présent dans la phase gazeuse ($n_{pNP,G} = x.n_{pNP,tot} = 10$ nmol ; $V_{mono} = 0,08$ cm³)

A partir des concentrations en pNP calculées au Tableau 28, le pH intrapore peut être estimé sous réserve que la quantité d'eau présente au sein des pores du monolithe est suffisante pour solvater les formes acide et basique du pNP.

$$pH_{apparent} = pKa + \log \frac{[pNP^-]_{monolithe}}{[pNP]_{monolithe}} = 7,15 + \log \frac{292}{482} = 6,93$$

Ce pH, proche du pKa du pNP, est en accord avec l'observation simultanée des deux formes acide et basique du pNP et identique au pH apparent observé pour l'exposition à partir d'une solution éthanolique de pNP.

II.3.3. Monolithe exposé à des pressions partielles de vapeurs saturantes de pNP dans une rampe à vide

Un montage en verre constitué d'une cuve en quartz connectée à un ballon (Figure 104) est utilisé pour cette expérience. Du pNP solide (solide cristallin jaune pâle) est placé dans le ballon et un monolithe est placé dans la cuve en quartz. Ce montage est relié à une pompe à vide ($P \approx 10^{-2}$ Torr soit 1,33 Pa). Le ballon est placé dans un bain d'huile chauffé à 110°C. Le spectre du monolithe est acquis régulièrement grâce à un spectrophotomètre portable Ocean Optics.

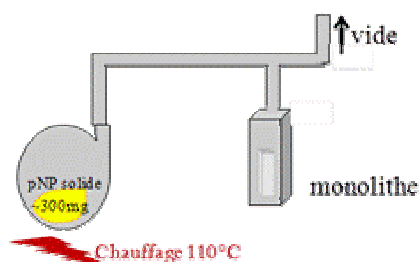


Figure 104. Représentation du montage exempt d'humidité mettant en présence un monolithe et du pNP sous forme solide.

Les vapeurs de pNP produites sont adsorbées à la surface des pores du monolithe. On observe une bande d'absorption entre 245 nm et 270 nm avec des structures vibrationnelles caractéristiques des hydrocarbures aromatiques monocycliques monosubstitués comme le toluène ou le phénol. Cette bande correspond à la transition $S_1 \leftarrow S_0$ du noyau aromatique. [305] Les pics observés jusqu'à présent entre 300 nm et 400 nm lors de l'adsorption de pNP en présence d'humidité sont absents du spectre. Le vide est ensuite rompu et le monolithe exposé à l'humidité de la pièce (HR = 55%) à 22°C.

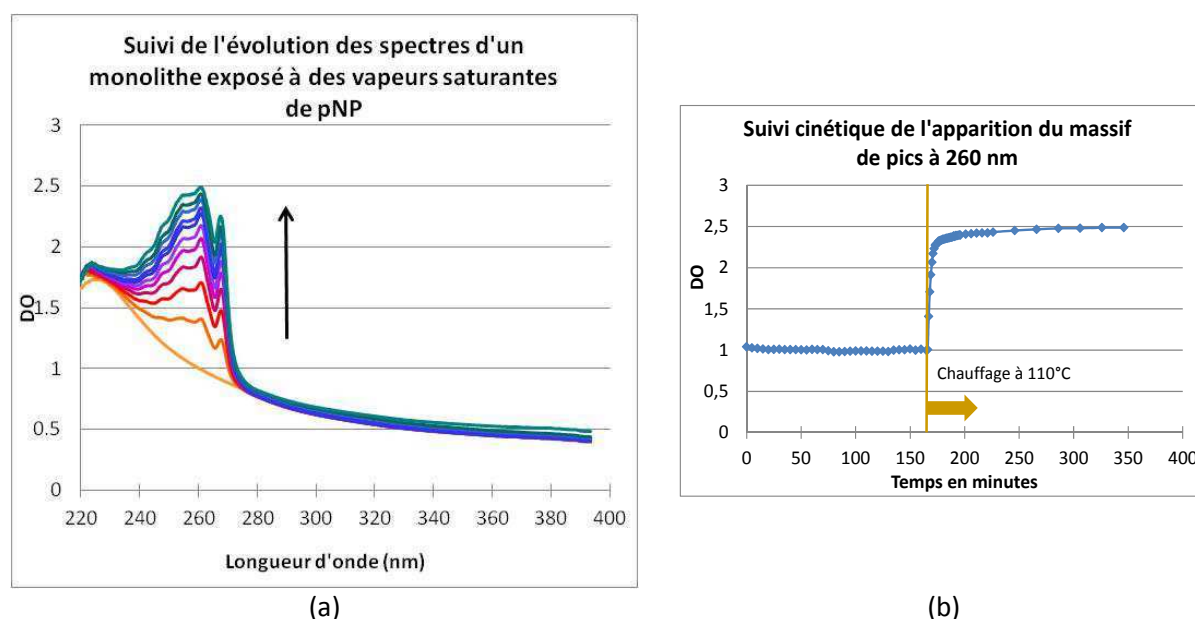


Figure 105. (a) Suivi de l'évolution du spectre du monolithe exposé à des vapeurs de pNP. (b) Suivi cinétique de l'évolution du pic à 260 nm en fonction du temps en minutes.

Lors de l'hydratation du monolithe par exposition à l'humidité de l'air ambiant, la bande d'absorption à structures vibrationnelles située 245 nm et 270 nm évolue progressivement vers les bandes d'absorption situées à 320 nm et 380 nm (Figure 106). Les molécules d'eau présentes dans l'air diffusent dans les pores du monolithe et viennent solvater les molécules de pNP. On retrouve le spectre d'un monolithe dopé avec 3% d'APTES exposé à une solution aqueuse de pNP (Figure 107) (§II.3.2.).

Après déconvolution du spectre du monolithe exposé à l'humidité pendant 4 jours, il est possible de calculer les concentrations en formes pNP et pNP⁻ présentes dans le monolithe et d'évaluer le pH intrapore.

$$pH_{\text{apparent}} = pKa + \log \frac{[pNP^-]_{\text{monolithe}}}{[pNP]_{\text{monolithe}}} = 7,15 + \log \frac{153}{256} = 6,92$$

La valeur de pH intrapore est identique aux pH intrapores déterminés pour l'exposition à partir de solution éthanolique ou aqueuse de pNP. Dans le cas présent, nous assistons à l'hydratation du monolithe et donc à la solvatisation du pNP. Ce résultat est

particulièrement intéressant car il nous permet d'évaluer le nombre nécessaire et suffisant de molécules d'eau à partir duquel on peut évoquer la notion de pH intrapore.

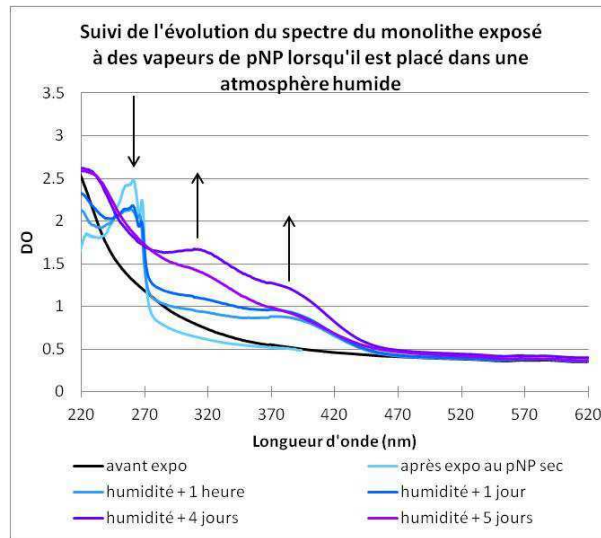


Figure 106 : Spectres d'un monolithe ayant été exposé à des vapeurs de pNP sous vide puis laissé quelques jours à pression atmosphérique (HR = 55%).

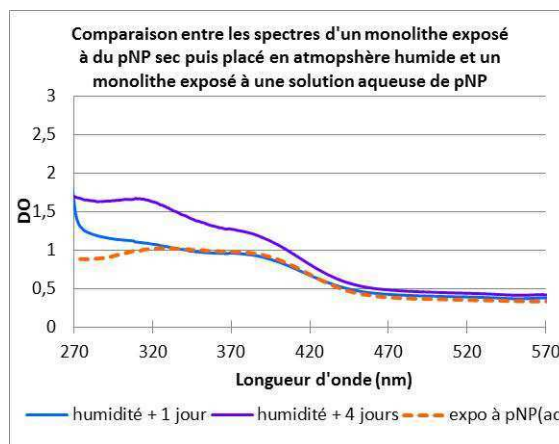


Figure 107 : Comparaison entre les spectres d'un monolithe exposé à des vapeurs de pNP en atmosphère sèche puis placé en milieu humide et un monolithe exposé à une solution aqueuse de pNP.

La loi de Poisson appliquée à la matrice dopée avec de 3% d'APTES ayant capté $153 \mu\text{M}$ de pNP^- et $256 \mu\text{M}$ de pNP (soit 32 nmol) prédit une répartition de $1,16 \cdot 10^{-2}$ molécule de pNP par pore. La matrice possède encore 97,8% de ses pores vides. Pour faciliter le calcul, on considère qu'il y a une molécule de pNP par pore. Le diamètre moyen des pores est de $\sim 50 \text{ \AA}$; en supposant un modèle de géométrie sphérique du pore ($V_{\text{pore}} = 65 \cdot 10^3 \text{ \AA}^3$) et un volume moléculaire estimé de 146 \AA^3 pour la molécule de pNP , il reste un volume disponible de $\sim 65 \cdot 10^3 \text{ \AA}^3$ pour les molécules d'eau ($V_{\text{eau}} = 30 \text{ \AA}^3$). Dans ces conditions, un pore pourrait contenir environ 2000 molécules d'eau pour une molécule de pNP soit un nombre largement suffisant pour solvater les formes acide et basique en équilibre.

Les variations spectrales de pNP en fonction de son environnement laissent présager un effet interférent important de l'eau dans les milieux biologiques.

II.3.4. Exposition à du pNP issu de l'hydrolyse enzymatique

Nous nous intéressons maintenant à la génération de pNP par des cultures bactériennes à partir de substrats osmogènes. Dans un premier temps, cette réaction est étudiée en solution. Puis, un monolithe est placé dans la phase gazeuse, au-dessus de cultures d'*E. coli* émettant du pNP, pour étudier la capture et la détection de pNP dans le monolithe.

Les expériences ont été réalisées avec deux milieux osmogènes différents dont la composition exacte est détaillée en Annexe 15.1 : [306]

– Un premier milieu tamponné avec de l'acide 3-(N-morpholino)propanesulfonique (MOPS) de $pK_a = 7,33$ proche du pK_a du p-nitrophénol ($pK_a = 7,15$) est utilisé. Ce milieu contient $114 \mu M$ de substrat osmogène (4-nitrophényl- β -D-glucuronide), des sels minéraux ($MgSO_4$, NaCl) et deux substrats capables d'induire l'activité β -D-glucuronidase (glucuronate de sodium et méthyl- β -D-glucuronide). Ce milieu est considéré pauvre en nutriments pour la multiplication des bactéries.

– Un autre milieu tamponné avec de l'acide 2-morpholino-éthanesulfonique (MES) de $pK_a = 6,1$ inférieur au pK_a du p-nitrophénol est utilisé afin de favoriser la formation de pNP sous forme acide qui est volatile. Il contient $113 \mu M$ de substrat osmogène (4-nitrophényl- β -D-glucuronide), les mêmes sels minéraux et les mêmes inducteurs d'activité β -D-glucuronidase que le milieu tamponné MOPS, des extraits de levure et de la bio-soyase. Ce milieu est enrichi en nutriments, favorisant la multiplication bactérienne donc la libération de pNP.

Afin de piéger dans un monolithe le pNP libéré par des cultures d'*Escherichia coli* (ATCC 11775), le montage suivant est réalisé (Figure 108). Un monolithe est placé dans une cuve rétrécie de spectrophotométrie. Un récipient contenant la culture bactérienne est placé au-dessus. Le tout est surmonté d'une autre cuve de spectrophotométrie pour fermer hermétiquement le montage.

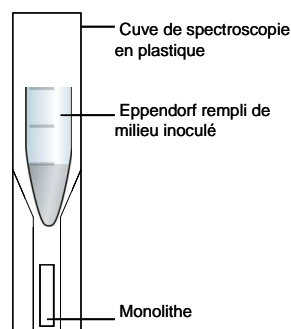


Figure 108 : Schéma du montage d'exposition d'un monolithe au pNP gazeux généré à partir du milieu inoculé

II.3.4.a Génération de pNP en milieu tamponné par le MOPS

Une étude préliminaire est réalisée en inoculant le milieu osmogène contenant 114 μM de substrat 4-nitrophényl- β -D-glucuronide (pNPG) tamponné avec du MOPS à $\text{pH} = 7,33$ avec $2 \cdot 10^5$ cfu/mL d'*E.coli* (ATCC 11775). Cette souche produit l'enzyme β -D-glucuronidase et peut hydrolyser la liaison entre le sucre (glucuronide) et le p-nitrophénol (Tableau 23).

Un échantillon du milieu ainsi inoculé est régulièrement prélevé pendant l'incubation à 37°C , filtré et son spectre d'absorption est acquis. Sur la Figure 109, la disparition progressive de la bande d'absorption centrée à $\lambda = 302$ nm témoigne de la dégradation du substrat pNPG. Au même moment, l'apparition de la bande d'absorption centrée à $\lambda = 401$ nm montre que le pNP a été libéré et est sous forme basique. Le point isobestique à $\lambda = 339$ nm représente l'équilibre entre le substrat 4-nitrophényl- β -D-glucuronide (pNPG) et le pNP sous sa forme basique (pNP⁻).

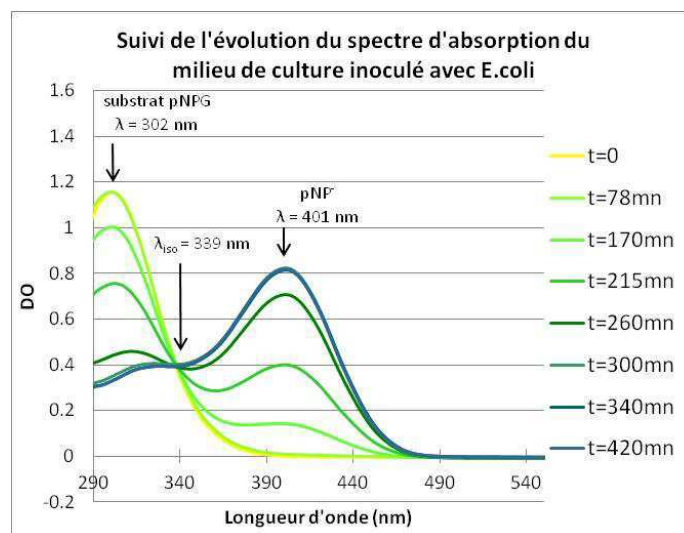


Figure 109 : Spectres d'absorption d'échantillons prélevés puis filtrés à différents temps d'incubation du milieu osmogène inoculé avec $2 \cdot 10^5$ cfu/mL d'*E.coli*.

Connaissant le coefficient d'extinction molaire de la forme basique du pNP, il est possible de convertir la DO mesurée à 401 nm à différents temps d'incubation en concentration de la forme pNP⁻ présente dans le milieu de culture liquide. Au préalable, pour faciliter la mesure de la concentration totale de pNP, un faible volume de soude concentrée est ajouté aux échantillons filtrés afin que tout le pNP présent dans le milieu soit sous forme basique absorbant à 401 nm.

L'évolution de la concentration en pNP pendant l'incubation est représentée sur la Figure 110. Un temps de latence de 200 minutes est observé. Cela signifie que 100 minutes d'incubation sont nécessaires aux bactéries pour être capable de produire l'enzyme β -D-glucuronidase. S'ensuit une phase pendant laquelle les bactéries se multiplient et dégradent le substrat (de 200 à 300 minutes). Au-delà de 300 minutes, la concentration atteint une valeur plateau de 70 μM . Comme le milieu contient 114 μM de substrat osmogène, soit les

bactéries ne consomment pas tout le substrat osmogène, soit une partie du pNP libéré par les bactéries est perdue dans la phase gazeuse.

Si les 44 μM de pNP manquant dans la phase liquide s'évaporent dans la phase gazeuse, la concentration de pNP en phase gazeuse serait de 22 μM ($V_L = 15 \text{ mL}$; $V_G = 30 \text{ mL}$). Cela correspondrait à une constante de Henry H_{CC} de :

$$H_{CC} = \frac{C_{i,G}}{C_{i,L}} = \frac{22 \cdot 10^{-6}}{70 \cdot 10^{-6}} = 0,314$$

Cette valeur est bien supérieure à celle de la littérature ($H_{CC} = 4,13 \cdot 10^{-5}$), ce qui laisse penser que les 44 μM de pNP manquants correspondent au pNP liés au substrat non métabolisé par les bactéries.

L'évolution de la densité bactérienne est également représentée sur la Figure 110. Ces valeurs sont obtenues par prélèvement, pendant l'expérience, d'échantillons de culture qui sont étalés sur des boîtes de Petri. Après incubation à 37°C pendant 24 heures, les colonies sont visibles à l'œil nu, énumérées et la concentration en cfu/mL du prélèvement est ainsi déduite. On observe aussi que la densité bactérienne continue d'augmenter au-delà de 300 minutes, ce qui nous amène à conclure que les bactéries consomment les autres nutriments du milieu et, pour une raison inconnue, ne consomment pas tout le substrat osmogène.

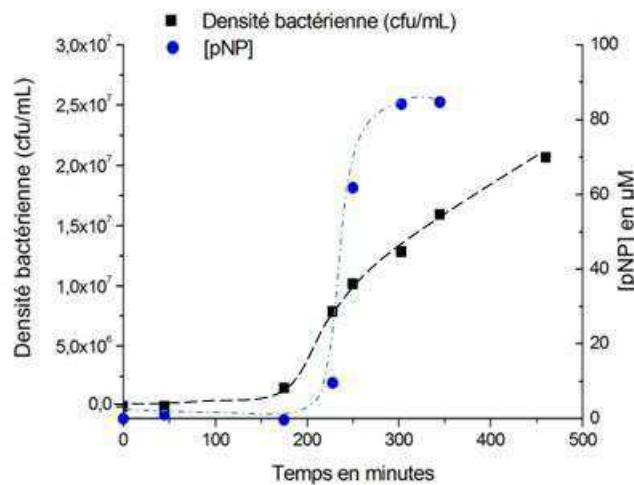


Figure 110 : Suivi de l'évolution de la concentration en pNP libre et de la densité bactérienne dans le milieu de culture osmogène inoculé avec *E. coli*.

Cette étude préliminaire réalisée dans un milieu de culture contenant le substrat 4-nitrophényl- β -D-glucuronide (pNPG) tamponné avec du MOPS et inoculé avec $2 \cdot 10^5$ cfu/mL d'*E. coli* montre que ces bactéries produisant l'enzyme β -D-glucuronidase sont capables de dégrader le substrat et de libérer le pNP en solution. Ces résultats montrent également que ni le substrat synthétique pNPG, ni le pNP libéré ne sont nocifs pour les bactéries. En effet, celles-ci se multiplient pendant l'incubation (Figure 110) et présentent, en phase exponentielle, un temps de génération de 63 minutes. Ce temps de génération est un peu plus long qu'en milieu riche où *E. coli* présente un temps de génération de 25 minutes environ.

Au bout de 17 heures d'incubation, 500 μL de culture ($\sim 10^7$ cfu/mL) sont prélevés et placés dans le montage d'exposition d'un monolithe de volume $V_G = 3$ mL (Figure 108). On estime qu'à ce moment, la concentration en pNP dans le milieu de culture est de 70 μM . Pour estimer la teneur en pNP en phase gaz, nous faisons appel à la loi de Henry. D'après la littérature, la constante de Henry H_{cc} est multipliée par 1,88 tous les 10°C. Nous disposons de la constante de Henry à 298,15 K soit 25°C donc à 35°C ($\approx 37^\circ\text{C}$), la constante de Henry est :

$$H_{cc,37^\circ\text{C}} = 1,88 \times 4,13 \cdot 10^{-5} = 7,76 \cdot 10^{-5}$$

En utilisant le calcul présenté au Chapitre 2 et en utilisant la constante de Henry à 35°C :

$$x = \frac{H_{cc} \frac{V_G}{V_L}}{1 + H_{cc} \frac{V_G}{V_L}} = \frac{7,76 \cdot 10^{-5} \frac{3}{0,5}}{1 + 7,76 \cdot 10^{-5} \frac{3}{0,5}} = 0,000465$$

$$\text{et } teneur = \frac{x \cdot n_{pNP, tot} \cdot V_m}{V_G} = \frac{0,000465 \cdot 3,5 \cdot 10^{-8} \cdot 24}{0,003} = 130 \text{ ppb}$$

La teneur en pNP dans le volume gazeux disponible est de 130 ppb. Au bout de 16 heures d'exposition, le monolithe, incolore au début de l'expérience, est devenu jaune (Figure 111).

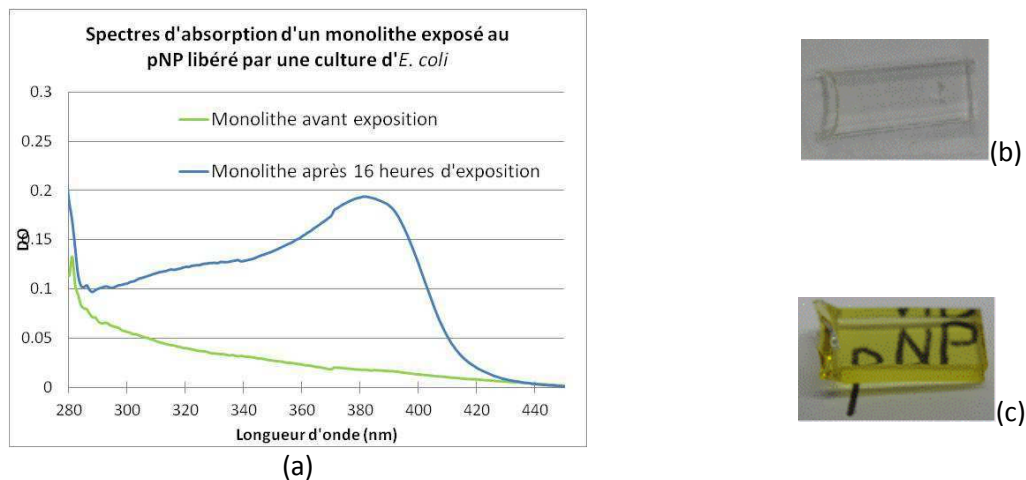


Figure 111 : Exposition d'un monolithe au pNP libéré (130 ppb) par une culture d'*E.coli*. (a) Spectres d'absorption du monolithe avant et après exposition ; (b) photo du monolithe avant exposition ; (c) photo du monolithe après exposition.

Le spectre d'absorption du monolithe présente une bande d'absorption large avec un maximum d'absorption vers 380 nm et un épaulement à 330 nm (Figure 111). D'après le spectre obtenu après déconvolution, seule la forme pNP^- est présente dans le monolithe à hauteur de 47,2 μM . Le volume d'un monolithe étant de 0,08 cm^3 , 4 nmol de pNP ont été piégées. Or, à l'équilibre, 130 ppb de pNP sont émis par la culture bactérienne soit 0,016 nmol de pNP. La quantité de pNP piégée est supérieure à la quantité de pNP dans la phase gazeuse à l'équilibre. Comme au paragraphe §II.3.2., on en déduit que le système n'est pas à

l'équilibre et que le monolithe agit comme une éponge et déplace cet équilibre, en piégeant les molécules de pNP ayant aussitôt quitté la phase liquide. Jusqu'à 35 nmol de pNP peuvent ainsi être détectées.

Le monolithe, exposé à un milieu de culture contenant du pNPG et environ 10^7 cfu/mL d'*E.coli*, a piégé le pNP libéré par les bactéries. La mise en évidence, en phase gazeuse, d'une activité enzymatique β -D-glucuronidase (présence d'*E.coli*) dans un milieu de culture a été réalisée et rendue possible grâce à l'incorporation d'un substrat osmogène dans le milieu de culture.

II.3.4.b Génération de pNP en milieu tamponné par le MES

La possibilité de détecter la présence d'une activité enzymatique β -D-glucuronidase a été démontrée. Il est à présent nécessaire de montrer que la libération de pNP n'a effectivement lieu qu'en présence de bactéries pouvant produire l'enzyme β -D-glucuronidase. A cet effet, six milieux de culture contenant le substrat osmogène 4-nitrophényl- β -D-glucuronide (pNPG) sont inoculés avec une souche de bactérie différente. Afin de diminuer le temps de génération des bactéries, le milieu utilisé est enrichi en nutriments pour favoriser la multiplication bactérienne. Il est tamponné avec du MES (pKa = 6,1) afin de favoriser la formation de pNP acide (forme volatile).

Parmi les six souches utilisées, les deux souches d'*Escherichia coli* (ATCC 11775 et ATCC 35421) sont considérées comme des souches β -D-glucuronidase positives car elles sont capables de produire l'enzyme β -D-glucuronidase. En revanche, *Hafnia alvei* (ATCC 13337), *Enterobacter cloacae* (ATCC 13047), *Pseudomonas putida* (ATCC 12633) et *Citrobacter freundii* (ATCC 8090) sont considérées comme des souches β -D-glucuronidase négatives car elles ne produisent pas l'enzyme β -D-glucuronidase (Tableau 30).

Six milieux de culture contenant le substrat osmogène 4-nitrophényl- β -D-glucuronide (pNPG) sont chacun inoculés avec 10^5 cfu/mL d'une espèce de bactéries. Au cours de l'incubation à 37°C, des échantillons de milieu sont régulièrement prélevés. La mesure de la DO à 550 nm est effectuée pour en déterminer la densité bactérienne² (Figure 112(a)). Ce même échantillon est ensuite filtré et additionné de soude concentrée pour que le pNP libéré soit sous forme basique (pNP⁻). Son spectre d'absorption est acquis pour connaître la quantité de pNP libéré par l'activité bactérienne (Figure 112(b)).

² Une étude préliminaire permettant de relier la DO à 550 nm à la densité bactérienne en cfu/mL a été réalisée. Elle consiste à prélever régulièrement des échantillons d'une culture de bactéries, à en mesurer la DO à 550 nm puis à l'étaler sur une boîte de Petri pour réaliser une énumération. Après incubation pendant 24 heures à 37°C de ces boîtes de Petri, les bactéries se sont multipliées et les colonies sont visibles à l'œil nu. Il est alors possible de relier la densité bactérienne en cfu/mL à la DO à 550 nm. L'étude a conclu que, pour *Escherichia coli*, une DO à 550 nm de 0,1 correspond à 2.10^7 cfu/mL. L'hypothèse que les autres souches bactériennes suivent la même relation est posée.

Espèce	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Citrobacter freundii</i>
N° ATCC de la souche	13337	11775	13047	35421	12633	8090
Activité β -D-glucuronidase	-	+	-	+	-	-
cfu/mL à l'inoculation	10^5	10^5	10^5	10^5	10^5	10^5
Exposition de monolithe	non	oui	non	non	non	non

Tableau 30 : Description des différentes souches utilisées pour inoculer un milieu osmogène (pNPG-MES).

Espèce	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Citrobacter freundii</i>
N° ATCC de la souche	13337	11775	13047	35421	12633	8090
Activité β -D-glucuronidase	-	+	-	+	-	-
Temps de génération	34 min	24 min	28 min	17 min	Très long	31 min
pNP libéré en phase liquide ?	Non	Oui	Non	Oui	Non	Non
[pNP]max	6 μ M	85 μ M	6 μ M	70 μ M	5 μ M	6 μ M

Tableau 31. Résultats obtenus pour chaque souche

Les six souches de bactéries se multiplient normalement dans le milieu de culture contenant le substrat osmogène. Cela signifie que ni le substrat ni le pNP libéré ne sont nocifs pour les bactéries testées. Le temps de génération est faible pour *Pseudomonas putida* (Tableau 31). Ce n'est pas dû au substrat osmogène mais à cette souche qui se multiplie lentement. Dans le milieu de culture, des concentrations de pNP autour de 80 μ M sont observées pour les deux souches d'*Escherichia coli*. Cette observation est en accord avec le résultat attendu. En effet, les deux souches d'*Escherichia coli* sont β -D-glucuronidase positives et sont capables de dégrader le substrat pour libérer le pNP. De même, comme attendu, les souches β -D-glucuronidase négatives (*Hafnia alvei*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas putida*, *Citrobacter freundii*) ne produisent pas d'enzyme β -D-glucuronidase et par conséquent, ne libèrent pas de pNP.

Pour ces souches, une concentration moyenne de 6 μ M de pNP est observée dans le milieu tout au long de la période d'incubation (Figure 112(b)). Cette valeur ne correspond pas à du pNP libéré. En effet, la concentration en pNP est calculée à partir de la valeur de la DO à 400 nm à partir du spectre d'absorption du milieu bactérien filtré et additionné de soude. Le substrat n'étant pas consommé, il absorbe sur une large plage de longueurs d'onde allant jusqu'à 420 nm. La DO à 400 nm non nulle n'est donc pas due à la libération de pNP mais à l'absorption du substrat ; c'est pourquoi une concentration de 6 μ M est obtenue pour les souches négatives.

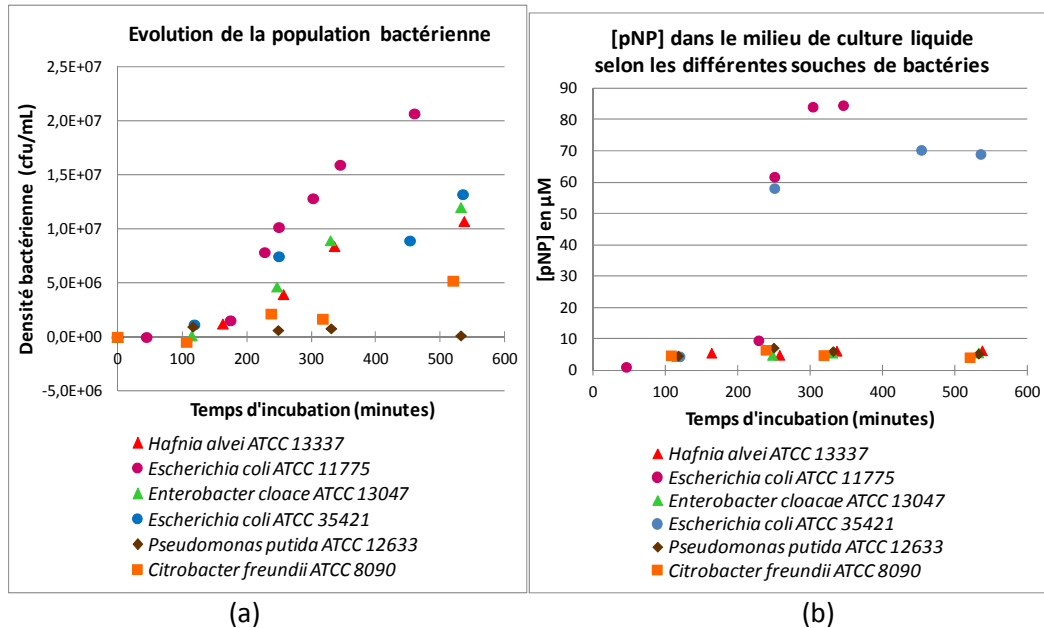


Figure 112 : Etude de l'activité β -D-glucuronidase de six souches de bactériennes cultivées dans un milieu osmogène contenant du 4-nitrophényl- β -D-glucuronide (pNPG). (a) Suivi de la densité bactérienne en fonction du temps d'incubation ; (b) Evolution de la concentration en pNP libéré dans le milieu de culture par différentes souches de bactéries.

Similairement à l'étude précédente, alors que la croissance bactérienne pour *E.coli* ATCC 11775 et ATCC 35421 continue de croître entre 150 et 500 minutes, la libération de pNP augmentent en fonction du temps entre 200 et 280 min et atteint rapidement un plateau à 300 min. Pour une raison inconnue, les bactéries *E.coli* ne consomment pas tout le substrat osmogène.

Lors de l'inoculation du substrat osmogène avec 10^5 cfu/mL d'*Escherichia coli* (ATCC 11775) soit à $t=0$, 1,5 mL de milieu inoculé sont prélevés et placés dans le montage d'exposition d'un monolithe ($V_G = 6$ mL). Le spectre d'absorption du monolithe est acquis régulièrement.

Au bout de 9 heures d'incubation soit à $t=9$ heures, l'opération est renouvelée : 1,5 mL de milieu inoculé d'*Escherichia coli* (ATCC 11775) soit $\sim 2 \cdot 10^7$ cfu/mL sont prélevés et placés dans le montage d'exposition d'un monolithe (Figure 108). On estime qu'à ce moment, la concentration en pNP dans le milieu de culture est de $80 \mu\text{M}$ (Figure 112(b)). Le volume gazeux disponible étant de 6 mL, la fraction molaire x de pNP présent en phase gazeuse puis la teneur en pNP sont calculées :

$$x = \frac{H_{CC} \frac{V_G}{V_L}}{1 + H_{CC} \frac{V_G}{V_L}} = \frac{7,76 \cdot 10^{-5} \frac{6}{1,5}}{1 + 7,76 \cdot 10^{-5} \frac{6}{1,5}} = 0,000310$$

$$\text{et } teneur = \frac{x \cdot n_{pNP, tot} \cdot V_m}{V_G} = \frac{0,000310 \cdot 1,2 \cdot 10^{-7} \cdot 24}{0,006} = 149 \text{ ppb}$$

Les spectres d'absorption des monolithes sont régulièrement acquis pendant 20 heures (Figure 113).

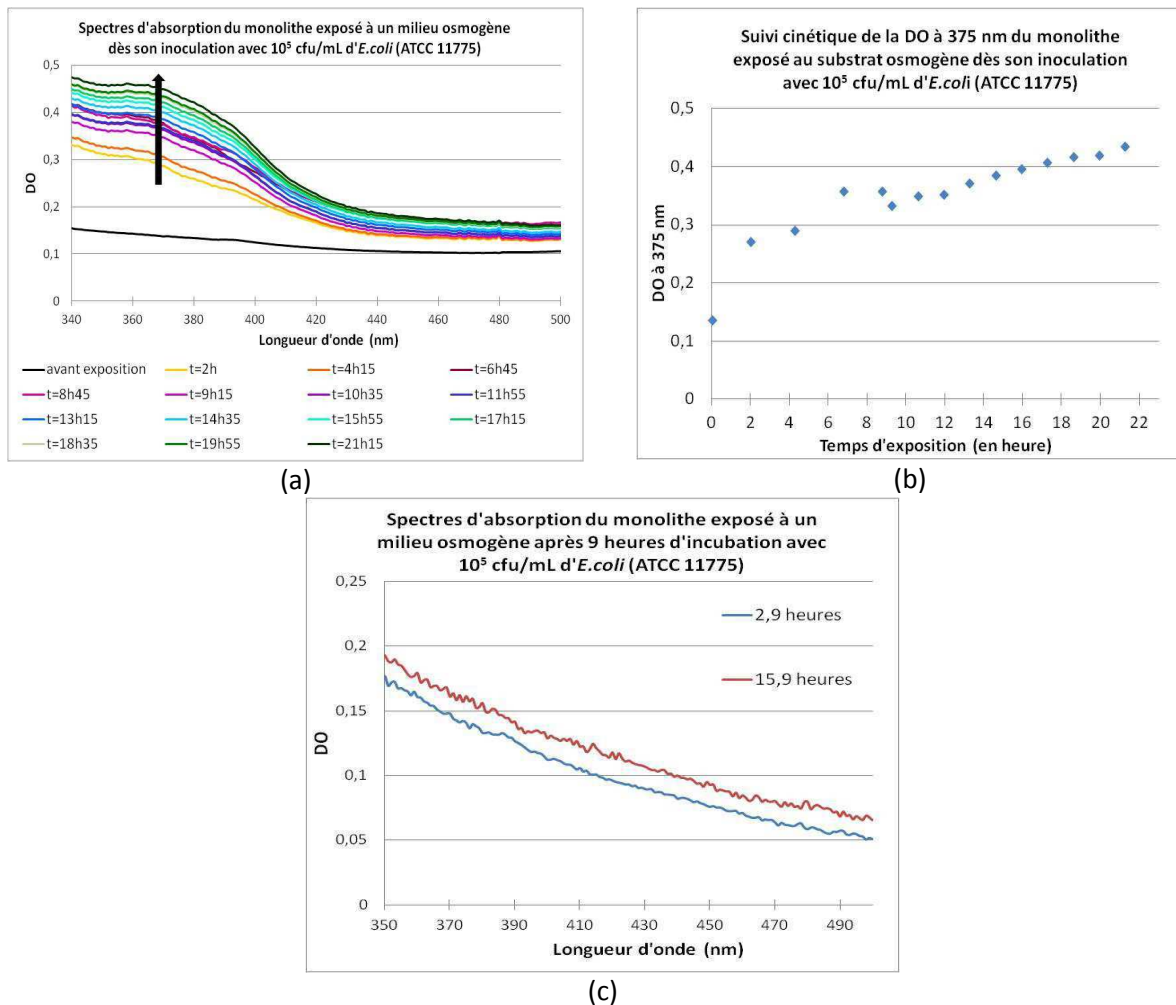


Figure 113. Adsorption de pNP émis par *E.coli* (ATCC 11775) au sein de monolithes. (a) et (b) Le monolithe est exposé à la culture dès l'inoculation soit à $t=0$, Spectres d'absorption du monolithe à différents temps d'exposition et suivi cinétique à 375 nm ; (c) Le monolithe est exposé à la culture d'*E. coli* après 9 heures d'incubation soit à $t=9$ heures, Spectres d'absorption du monolithe à 2,9 heures et 15,9 heures d'exposition.

Une bande d'absorption avec un maximum centrée autour de 375 nm est observée lorsque le monolithe est exposé, et ce dès l'inoculation du milieu osmogène (Figure 113(a) et (b)). Ce spectre correspond à celui du pNP libéré par les cellules *E. coli*. En revanche, le monolithe exposé à une culture d'*E. coli* incubée depuis 9 heures ne capte pas de pNP (Figure 113(c)). La capture du pNP dans un monolithe semble difficile à reproduire en milieu biologique.

La culture bactérienne rend le milieu d'exposition très humide. Il se peut que l'eau agisse comme un interférent et s'adsorbe préférentiellement à la surface des pores des monolithes par rapport au pNP. La formulation de la matrice doit être améliorée de façon à privilégier l'adsorption de pNP par rapport à l'eau. Les résultats obtenus avec les monolithes

préparés avec des précurseurs alcoxydes contenant des chaînes polyéthylène glycol sont encourageants et pourraient être utilisés pour l'exposition en milieu biologique.

III. Mise en évidence de l'activité arylamidase : détection de la β -naphthylamine

La présence d'enzymes L-alanine-aminopeptidases chez une bactérie est, selon certains auteurs, caractéristiques des bactéries à Gram négatif. [296,297] L'utilisation d'un substrat osmogène nécessitant une enzyme L-alanine-aminopeptidase pourrait donc permettre la discrimination entre des bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Le substrat L-alanine- β -naphthylamide est choisi pour mettre en évidence une activité L-alanine- β -naphthylamidase via la formation de β -naphthylamine (Figure 114).

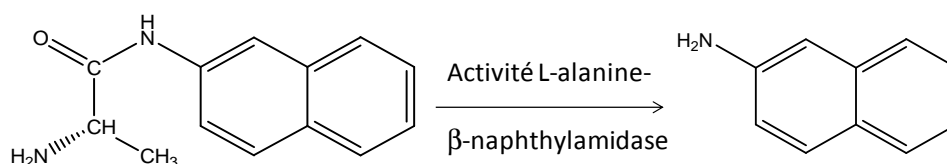


Figure 114 : Libération de β -naphthylamine sous l'action de l'enzyme L-alanine- β -naphthylamidase sur le substrat L-alanine- β -naphthylamide.

La β -naphthylamine (β -NA) peut être détectée selon deux modes :

- Par réaction colorimétrique entre la β -naphthylamine (β -NA) et le diméthylaminocinnamaldéhyde (DMACA) qui entraîne la formation d'un produit rouge absorbant à $\lambda_{\text{max}} = 540 \text{ nm}$. [307] Le DMACA absorbant vers 400 nm, la détection est possible car la molécule sonde et le produit de réaction n'absorbent pas aux mêmes longueurs d'onde. [308]

- Par détection en fluorescence. En effet, la β -naphthylamine, lorsqu'elle est excitée à $\lambda_{\text{ex}} = 335 \text{ nm}$, émet de la fluorescence à $\lambda_{\text{em}} = 410 \text{ nm}$. [309] Il est possible de la capter et de la détecter au sein d'un monolithe sans sonde.

III.1. Détection colorimétrique de la β -naphthylamine (β -NA)

III.1.1. Etude de la réaction entre le DMACA et la β -NA en solution

La β -naphthylamine réagit en milieu acide avec le diméthylaminocinnamaldéhyde (DMACA) pour former un composé azo rouge absorbant à 540 nm (Figure 115(a) et (b)). [307] La réaction se déroule en deux temps : la β -naphthylamine qui est nucléophile attaque la fonction aldéhyde du DMACA. S'ensuit une réaction de condensation catalysée par les ions H⁺ qui conduit à la formation du composé azo et d'une molécule d'eau.

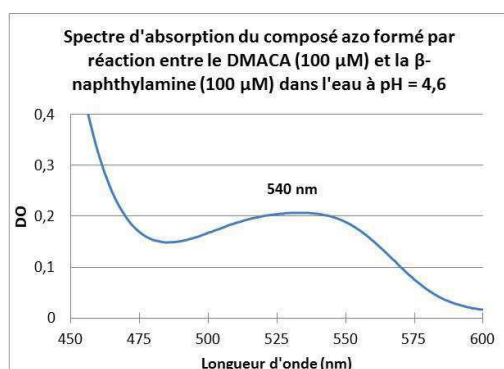
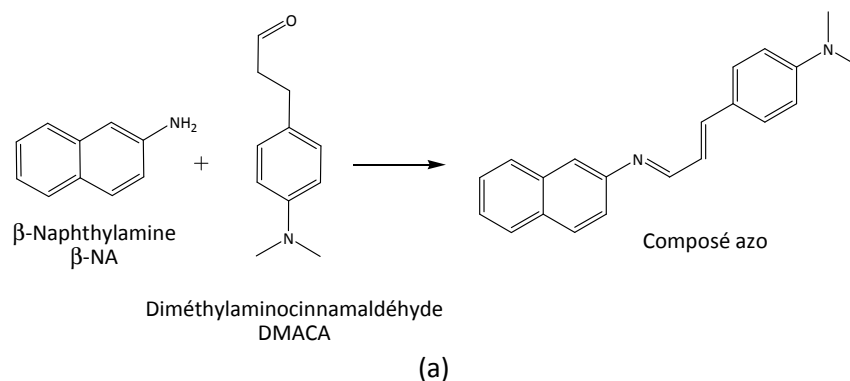


Figure 115 : (a) Schéma de la réaction de détection entre molécule sonde (DMACA) et COV-cible (β -NA) ; (b) Spectre d'absorption du produit azo absorbant à 540 nm ; (c) photo d'une solution de DMACA ayant réagi avec la β -NA pour former le produit azo de couleur rouge.

La réaction a été étudiée dans l'eau et dans l'éthanol. Dans l'eau, la β -naphthylamine possède un $pK_{a_{\beta\text{-NA}}}$ de 4,16 [310] et le DMACA, un $pK_{a_{\text{DMACA}}}$ de 3,18. [308] Pour optimiser la réaction, il est nécessaire de se situer à $pH > pK_{a_{\beta\text{-NA}}}$ c'est-à-dire à $pH > 4,16$ pour que la β -naphthylamine soit sous forme basique qui est sa forme réactive (nucléophile). Toutefois, pour que la réaction de condensation catalysée par les ions H^+ ait lieu, il ne faut pas excéder un pH de 5-6.

Le DMACA est une espèce dont la forme neutre absorbe fortement à 385 nm ($\epsilon_{383\text{nm}} = 35100 \pm 1020 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) et dont la forme protonée absorbe plus faiblement à 280 nm ($\epsilon_{276\text{nm}} = 22300 \pm 650 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) (Figure 116). Afin de ne pas être gêné par la bande d'absorption du DMACA sous sa forme neutre, il serait préférable de travailler à $pH < pK_{a_{\text{DMACA}}}$ c'est-à-dire à $pH < 3,18$.

Ces deux conditions, $pH > 4,16$ et $pH < 3,18$, sont contradictoires. Une étude expérimentale permettra de déterminer les conditions optimales pour que la réaction ait lieu rapidement sans que la forte absorption du DMACA ne nuise à la sensibilité de la détection.

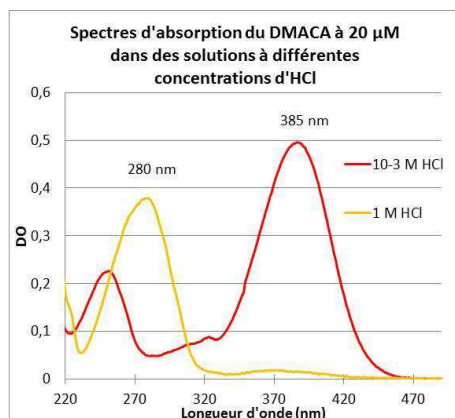


Figure 116 : Spectres d'absorption des deux formes du DMACA : la forme neutre absorbe à 385 nm tandis que la forme protonée absorbe à 280 nm.

Dans l'eau, la réaction est réalisée pour différents pH compris entre 2 et 10 (Figure 117). La réaction a lieu en 10 minutes à pH = 4 mais pas à pH = 2 ni au-delà de pH = 7. A pH = 4, le DMACA est présent sous sa forme neutre et absorbe fortement à 385 nm. Pour que le suivi de l'absorption du produit formé à $\lambda_{\max} = 540 \text{ nm}$ ne soit pas entravé par l'absorption du DMACA, de faibles concentrations de DMACA devront être utilisées.

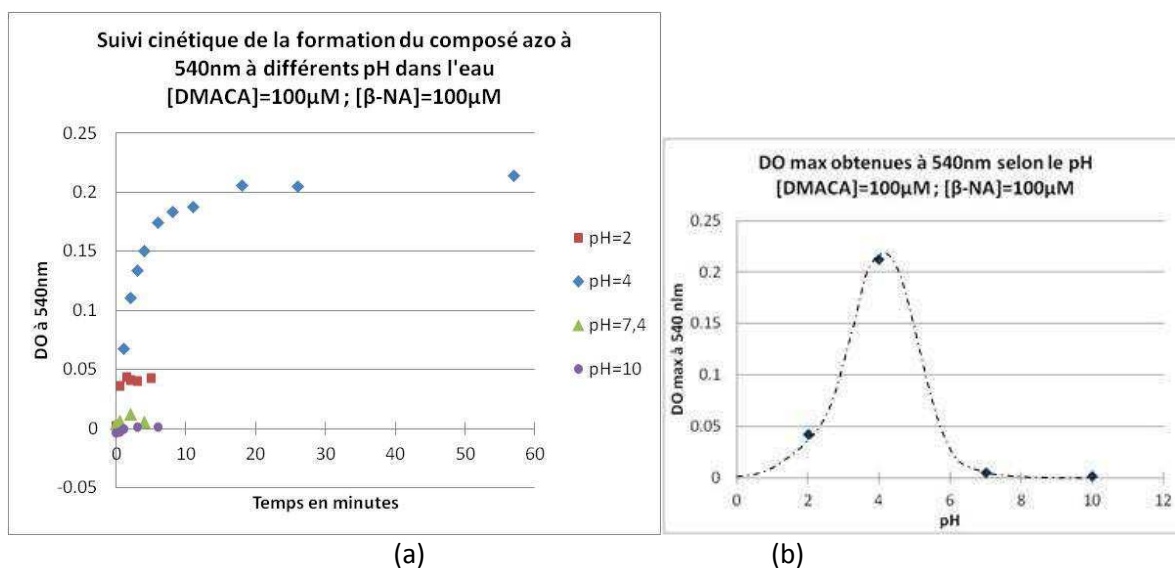


Figure 117 : Etude de la réaction de formation du produit azo dans l'eau à différents pH. (a) Suivi cinétique de l'apparition du pic à 540 nm, caractéristique du produit azo ; (b) Intensité maximale du pic d'absorption du composé azo obtenue en fonction du pH.

La surface des monolithes synthétisés par voie sol-gel présentant des groupements silanols, résidus d'une polycondensation incomplète des alcoxydes de silicium, l'éthanol est utilisé comme solvant de réaction pour reproduire un environnement similaire à celui d'une matrice de silicate. Différentes concentrations en acide chlorhydrique y sont introduites pour déterminer les conditions de réaction optimales (Figure 118).

Pour des concentrations en acide chlorhydrique comprises entre 10^{-4} M et 10^{-2} M , le rendement est optimal (Figure 118(b)) et le produit azo est formé en moins de 10 minutes (Figure 118(a)). Cependant, pour ces concentrations, le DMACA absorbe fortement vers

400 nm ce qui est gênant pour la détection à 540 nm du produit azo. Un compromis doit être réalisé. Le choix se porte sur une concentration de 0,5 M d'acide chlorhydrique car dans ces conditions, la quantité de produit azo formé reste intéressante tout en favorisant la protonation du DMACA qui absorbe alors à 280 nm.

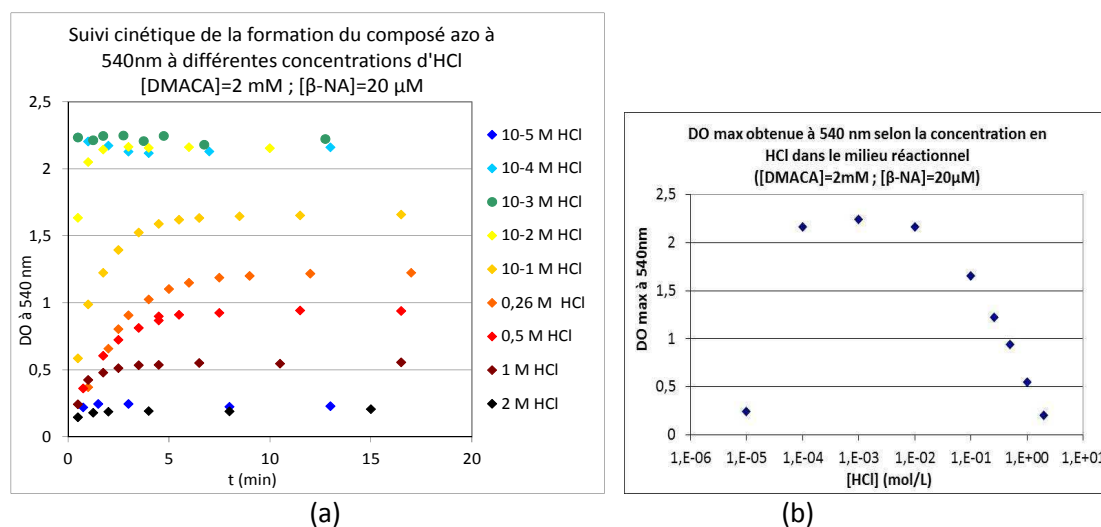


Figure 118 : Etude de la formation du produit azo dans l'éthanol contenant différentes concentrations d'HCl. (a) Suivi cinétique de l'apparition du pic à 540 nm, caractéristique du produit azo ; (b) intensité maximale du pic d'absorption du composé azo obtenu en fonction de la concentration en HCl.

La réaction de formation du produit azo dépend du solvant utilisé. Dans l'eau, le pH optimal pour la formation du produit azo est pH = 4. En revanche, dans l'éthanol, la concentration optimale d'acide chlorhydrique à utiliser est 0,5 M.

III.1.2. Caractérisation du produit azo

Le coefficient d'extinction molaire du produit azo est déterminé à 540 nm dans l'éthanol contenant 0,5 M d'acide chlorhydrique (Figure 119). Sa valeur est de $\epsilon = 47\,000 \pm 2900 \text{ mol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ce qui est intéressant pour une détection colorimétrique.

Les spectres de masse des réactifs et du mélange réactionnel sont acquis dans le méthanol avec un spectromètre Finnigan LTQ (ThermoScientific). Le spectre de masse de β -NA présente un pic principal à $m/z = 144$ ce qui correspond à la masse molaire d'une molécule de β -NA protonée une fois. Le spectre de masse du DMACA présente un pic à $m/z = 176$ ce qui correspond à la masse molaire d'une molécule de DMACA protonée une fois. D'autres pics sont observés à $m/z = 190$; 222 ; 254 . L'étude n'a pas été approfondie pour connaître la nature du pic à $m/z = 190$. En revanche, il semble que les pics à $m/z = 222$ et 254 correspondent à des adduits de méthanol ($m/z = 32$): $222 = 190 + 32$ et $254 = 190 + 2 \times 32$.

On retrouve sur le spectre de masse du milieu réactionnel (Figure 120) les pics observés sur les spectres de masse des réactifs. Un nouveau pic à $m/z = 301$ est observé et correspond à la masse d'une molécule de produit azo protonée une fois.

Le produit azo issu de la condensation du DMACA et de la β -NA est bien formé et sa présence est mise en évidence sur le spectre de masse du milieu réactionnel.

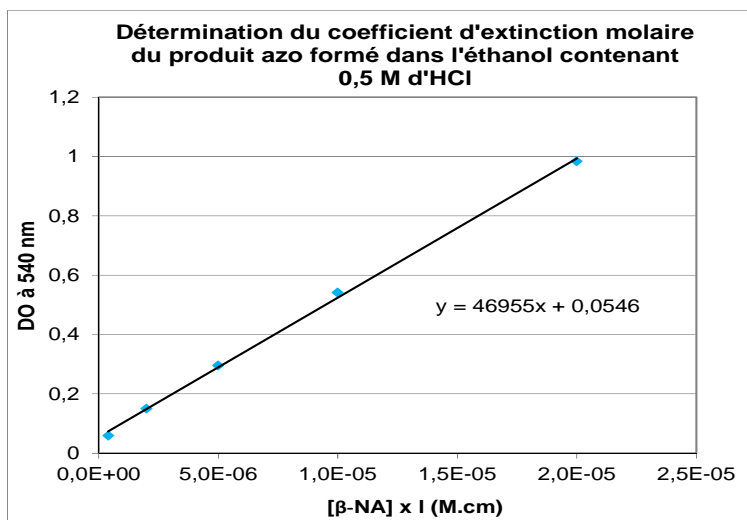


Figure 119 : Détermination du coefficient d'extinction molaire du produit azo à 540 nm dans l'éthanol acidifié à 0,5 M d'HCl.

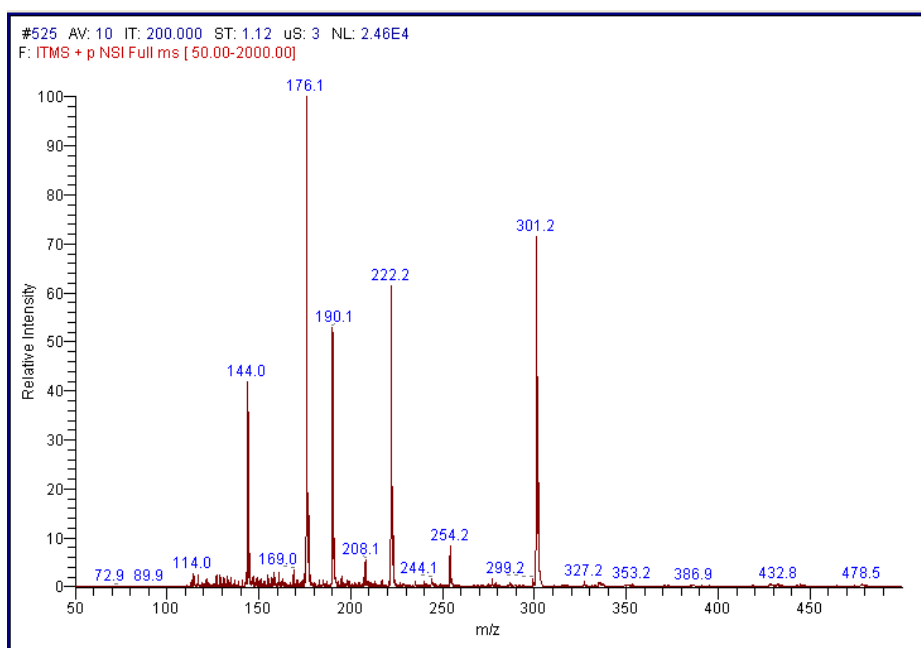


Figure 120 : Etude en spectrométrie de masse du produit de la réaction entre la β -NA et le DMACA. Spectre de masse du milieu réactionnel et mise en évidence de la formation du produit azo de masse molaire 300 g/mol (présence du pic M+H = 301).

III.1.3. Evaluation de la réaction du DMACA avec des interférents

Le DMACA est une molécule réactive qui peut réagir avec d'autres composés que la β -naphthylamine. Le DMACA est déjà largement utilisé pour détecter l'indole et il réagit également avec le tryptophane, acide aminé pouvant être dégradé en indole. [311] Le scatole, qui est un dérivé méthylé de l'indole, et la 2'-aminoacétophénone peuvent également réagir avec le DMACA.

La réaction entre ces 4 interférents et le DMACA est étudiée. Pour cela, une solution éthanolique à 2 mM de DMACA acidifiée avec 0,5 M d'acide chlorhydrique est mise en présence d'un volume d'interférent tel que [interférent] = 20 μ M (Tableau 32).

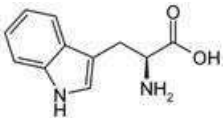
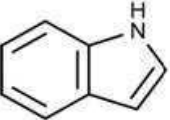
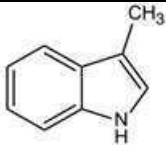
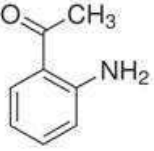
Interférent Constante de Henry H_{CC} (sans dimension) à 298,15K	Propriétés optiques du produit formé		
	Pic 1	Pic 2	Pic 3
Tryptophane  $H_{CC} = 8,1.10^{-13}$	$\lambda_{max} = 542 \text{ nm}$ $\epsilon < 100 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$	$\lambda_{max} = 545 \text{ nm}$ $\epsilon < 100 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$	$\lambda_{max} = 660 \text{ nm}$ $\epsilon < 100 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ₁
Indole  $H_{CC} = 2,16.10^{-5}$	$\lambda_{max} = 624 \text{ nm}$ $\epsilon = 103900 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ₁	-	-
Scatole  $H_{CC} = 8,7.10^{-5}$	$\lambda_{max} = 620 \text{ nm}$ $\epsilon < 18592 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$	$\lambda_{max} = 664 \text{ nm}$ $\epsilon < 26881 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$	-
2'-amino-acétophénone  $H_{CC} = 1,4.10^{-7}$	$\lambda_{max} = 550 \text{ nm}$ $\epsilon = 5535 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$	-	-

Tableau 32 : Tableau récapitulatif des produits formés entre le DMACA et les interférents.

Le tryptophane forme avec le DMACA un composé qui absorbe à 542 et 545 nm, longueurs d'onde auxquelles est observé le maximum d'absorption pour le produit de réaction entre le DMACA et la β -NA. Cependant, le produit présente un coefficient d'extinction molaire très médiocre ($\epsilon < 100 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$). De plus, la constante de Henry du tryptophane est faible ($H_{CC} = 8,1.10^{-13}$). Le tryptophane n'est pas considéré comme un interférent.

L'indole forme avec le DMACA un produit qui absorbe fortement à 624 nm. Les bandes d'absorption de l'indole et du produit formé entre le DMACA et la β -NA sont suffisamment éloignées pour permettre la détection de ce dernier. L'indole n'est pas considéré comme un interférent.

Le scatole, pour les mêmes raisons que pour l'indole, ne sera pas considéré comme un interférent car les maxima d'absorption du spectre du produit de réaction entre le DMACA et le scatole sont loin du maximum d'absorption du produit de la réaction entre le DMACA et la β -NA. Ce résultat est en accord avec les observations faites par Lombard *et al.*

[312] qui remarquent l'apparition d'une couleur violette pour de faibles quantités de scatole introduites (produit bleu) dans des solutions aqueuses concentrées de DMACA (orange foncé/rouge).

Pour terminer, la 2' aminoacétophénone pourrait être considérée comme un interférent car l'absorption maximale du produit issu de sa réaction avec la β -NA se trouve à la même longueur d'onde que le produit de la réaction entre le DMACA et la β -NA. Cependant, le coefficient d'extinction molaire du produit de la réaction entre le DMACA et la 2' aminoacétophénone est médiocre. De plus, la constante de Henry de la 2' aminoacétophénone est inférieure à celle de la β -NA ($H_{CC} = 3,3 \cdot 10^{-6}$; [313]). Elle n'est pas considérée comme un interférent.

III.1.4. Choix des souches pour la mise en évidence de l'activité L-alanine- β -naphthylamidase

Plusieurs souches de micro-organismes (Gram positif ou Gram négatif) sont utilisées pour la mise en évidence de l'activité L-alanine- β -naphthylamidase (Tableau 33).

Un substrat gélosé présentant une concentration de 250 μ M de substrat osmogène L-alanine- β -naphthylamide (L-ala- β NA) ainsi que d'autres nutriments favorables à la multiplication des bactéries sont utilisés (Annexe 15.2). Plusieurs boîtes de Petri contenant ce milieu sont inoculées avec plusieurs colonies d'une souche différente de bactérie puis incubées pendant 24 heures à 37°C. Afin d'éviter que la β NA formée ne s'échappe, les boîtes de Petri sont parafilmées.

Les colonies qui se sont formées sont ensuite prélevées et introduites dans 800 μ L d'une solution éthanolique de 500 μ M de DMACA acidifiée avec 0,5 M d'acide chlorhydrique. Les solutions sont microfiltrées avant l'acquisition du spectre d'absorption pour éviter toute perturbation due à la diffusion. Les solutions contenant les souches de bactéries ayant libéré de la β -naphthylamine deviennent rose et leur spectre d'absorption présente un maximum à 540 nm. Ce sont des souches L-alanine- β -naphthylamidase-positives. En absence de β -naphthylamine, la solution reste jaune pâle.

Le substrat gélosé contient de la tryptone qui est composée d'une variété d'acides aminés dont le tryptophane. Les bactéries pouvant produire l'enzyme tryptophanase entraîneront la formation d'indole. Or l'indole a été étudié comme interférent et il réagit avec le DMACA pour donner un produit azo présentant un maximum d'absorption à 624 nm. Les souches tryptophanase-positives entraînent l'apparition d'une coloration bleu au bout de quelques minutes.

Les résultats obtenus remettent en question la spécificité de l'activité L-alanine- β -naphthylamidase chez les bactéries à Gram négatif. En effet, la bactérie à Gram positif *Staphylococcus intermedius* et l'eucaryote *Candida albicans* présentent tous deux une activité l'activité L-alanine- β -naphthylamidase. Le substrat osmogène L-alanine- β -naphthylamide n'est pas adapté à la discrimination Gram+/Gram-.

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

Tableau 33 : Caractéristiques enzymatiques des souches étudiées pour la mise en évidence de l'activité L-alanine- β -naphthylamidase.

Toutefois, l'étude de la détection de la β -naphthylamine en monolithe est poursuivie car ce mCOV continue de nous intéresser. En effet, la β -naphthylamine peut être couplée via sa fonction amine à une grande variété de peptides pour former d'autres substrats osmogènes. Les résultats pourront servir à la mise en évidence d'autres activités enzymatiques.

III.1.5. Synthèse et caractérisation de monolithe dopés DMACA

Plusieurs formulations de sol sont préparées pour l'obtention de monolithes permettant la détection de β -naphthylamine en phase gazeuse.

D'après l'étude en solution, deux situations de détection sont à prendre en compte. Si l'on considère que la surface des pores d'un monolithe est recouverte de fonctions silanols, il faudra utiliser la conclusion de l'étude en solution dans l'éthanol, c'est-à-dire incorporer dans le sol une quantité d'acide chlorhydrique permettant d'obtenir une concentration finale de 0,5 M HCl dans le monolithe.

Cependant, le monolithe étant voué à être utilisé en milieu biologique donc en milieu humide, on peut supposer que les pores des monolithes contiendront des molécules d'eau en proportion non négligeable. La réaction de détection entre le DMACA et la β -NA n'ayant pas lieu pour des concentrations en acide différentes de 10^{-4} M HCl, il faudra préparer un sol permettant d'obtenir des monolithes dont la concentration en acide vaut 10^{-4} M HCl.

Des monolithes contenant différentes quantités d'acide chlorhydrique sont donc préparés et le détail de leur composition est présenté dans le Tableau 34. Le sol est préparé à partir de précurseurs tétraméthylorthosilicate (TMOS), aminopropyl-triéthoxysilane (APTES) mélangés à du méthanol (MeOH) et de l'eau avec un ratio molaire de TMOS/APTES/MeOH/eau valant 1/0,03/5/4.












[DMACA] mono	[HCl] _{mono}	Couleur/aspect	[DMACA] mono	[HCl] _{mono}	Couleur/aspect
50 mM	1 M	Orange 	2 mM	2 M	Orange clair 
10 mM	0,5 M	Rouge 	100 μ M	0,5 M	Jaune 
10 mM	1,04 M	Jaune orange 	100 μ M	10^{-4} M	Jaune 
10 mM	2 M	Jaune orange 	500 μ M	10^{-2} M	Jaune 
2 mM	0,5 M	Orange 	1 mM	10^{-2} M	Orange 
2 mM	1,04 M	Orange clair 			

Tableau 34 : Composition des monolithes préparés pour la détection de β -naphthylamine en phase gazeuse.

Le profil en concentration du monolithe dopé avec 2 mM de DMACA et 0,5 M d'HCl est réalisé car la couleur de sa partie supérieure semble plus rouge (Figure 121(a)).

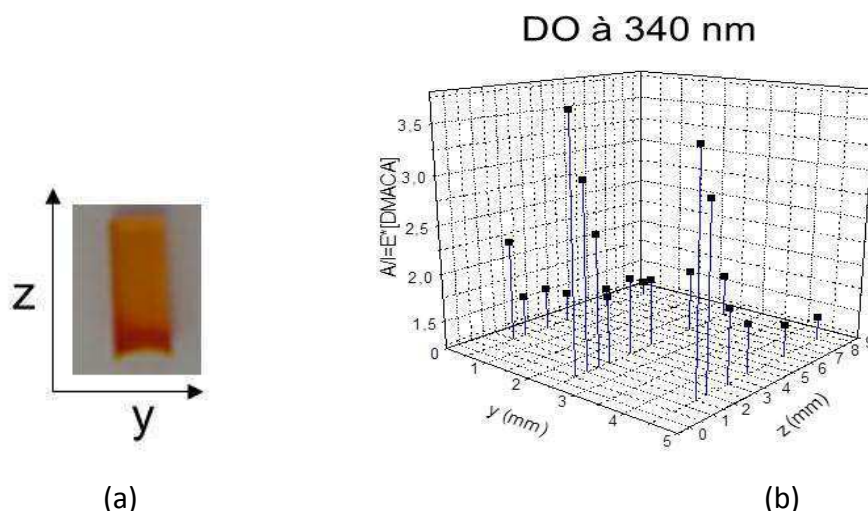


Figure 121 : (a) Photo du monolithe dopé avec 2 mM de DMACA et 0,5 M d'HCl et étudié en profil de concentration ; (b) profil de concentration en DMACA dans le monolithe.

Le profil du monolithe en concentration montre qu'effectivement la concentration en DMACA est plus élevée au niveau du ménisque c'est-à-dire au niveau de la partie supérieure du monolithe. Comme constaté au paragraphe II.2.2, lors du séchage, le solvant entraîne avec lui la molécule sonde vers la face supérieure du monolithe, celle où se produit l'évaporation pendant le séchage. Le DMACA n'étant pas une molécule volatile, il s'accumule au niveau de cette face.

III.1.6. Exposition de monolithes à la β -NA en phase gaz

Tous les monolithes synthétisés ont été exposés à 107 ppm de β -NA. Le montage d'exposition est décrit dans la Figure 122. Un récipient en verre ($V_G = 27$ mL) fermé contient le monolithe à exposer et un morceau d'aluminium chauffé à 60°C . Au moment $t=0$ de l'exposition, $11 \mu\text{L}$ d'une solution éthanolique de β -NA 10,9 mM sont déposés sur le morceau d'aluminium. Le montage est ensuite placé dans une étuve à 37°C .

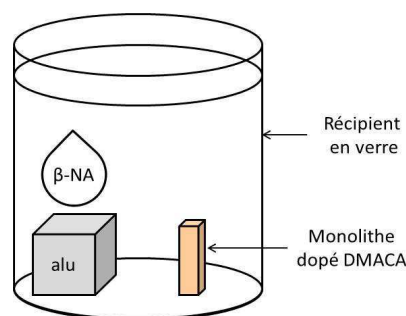


Figure 122 : Schéma représentatif du montage d'exposition de monolithe dopé DMACA exposé à de la β -naphthylamine, par évaporation d'une solution éthanolique de β -NA.

Le spectre d'absorption des monolithes est acquis avant et après 24 heures d'exposition. Seul le monolithe dopé avec 2 mM de DMACA et 0,5 M d'acide chlorhydrique réagit (Figure 123).

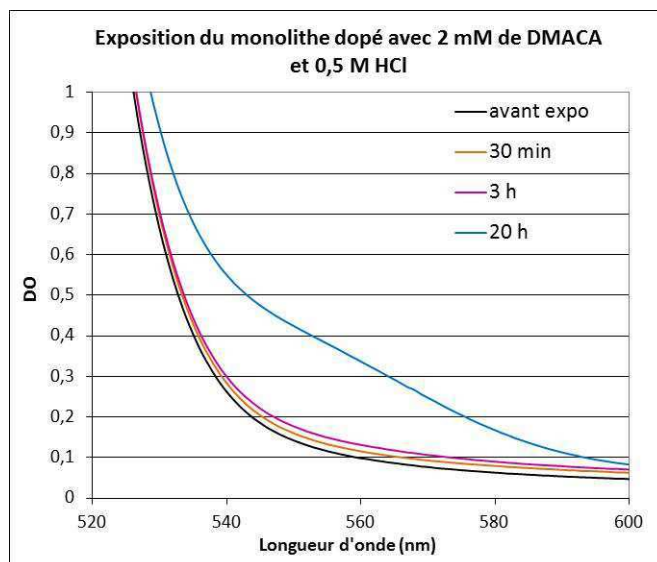


Figure 123 : Spectres d'absorption d'un monolithe de formule [DMACA] = 2 mM et [HCl] = 0,5 M exposé à 107 ppm de β -naphthylamine ($V_{\text{mono}} = 0,08 \text{ cm}^3$; épaisseur $\approx 0,2 \text{ cm}$)

Une nouvelle absorption apparaît au bout de 20 heures sous la forme d'un épaulement autour de 560 nm. A partir de la variation d'absorption à 540 nm ($\Delta\text{DO} = 0,288$), la concentration produit azo formé dans le monolithe a été déterminée. Elle est égale à 30 mM, soit un nombre total de mole de $\sim 2 \text{ nmol}$ de composé azo. Le monolithe n'a détecté qu'environ 1,6 % de la β -NA présente dans la phase gazeuse, mais la variation d'absorption à 540 nm est suffisamment élevée pour détecter cette faible quantité

L'étude de la détection colorimétrique de la β -naphthylamine est finalement plus complexe qu'on ne l'imaginait. Dans l'eau, pour que la β -NA soit réactive, le pH de la solution doit être supérieur au pKa de la β -NA, soit à 4,16. Mais pour ne pas être gêné par la forte absorption du DMACA, il faut se situer dans une zone de pH favorisant la forme qui absorbe à 280 nm, soit être à un pH inférieur au pKa du DMACA (3,18).

La concentration en acide chlorhydrique nécessaire à la réaction entre le DMACA et la β -NA dépend de la nature du solvant (eau ou éthanol). Cela signifie que la réaction en monolithe pourra être influencée par la présence d'humidité dans l'environnement de mesure. Parmi les monolithes synthésés, une formulation ([DMACA] = 10 mM ; [HCl] = 0,5 M) permet de détecter la β -naphthylamine entre 3 et 20 heures d'exposition. L'étude de cette formulation devra être approfondie afin de déterminer la sensibilité et le temps de réponse de ce monolithe. La concentration hétérogène de la sonde dans le monolithe est un problème important auquel il faudra remédier, en modifiant, par exemple, la forme du monolithe. Un monolithe plus large que haut permettrait de diminuer le gradient de concentration en molécule sonde. Un monolithe de faible chemin optique permettrait de s'affranchir de la forte absorption de la molécule sonde à 385 nm et de doper le capteur avec une forte concentration de DMACA. Diminuer la taille du monolithe apporterait également l'avantage d'une adsorption plus rapide du mCOV dont une concentration plus homogène en en mCOV.

III.2. Détection en fluorescence de la β -naphthylamine

III.2.1. Propriétés de la β -naphthylamine

La β -naphthylamine absorbe à 235 nm et plus faiblement à 280 nm et 340 nm (Figure 124(a)). Elle possède d'ailleurs un faible coefficient d'extinction molaire à 340 nm ($\epsilon_{340\text{nm}, \text{MeOH}} = 2000 \pm 70 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). Cette molécule fluorescente émet à $\lambda_{\text{ém}} = 410 \text{ nm}$ lorsqu'elle est excitée à $\lambda_{\text{ex}} = 340 \text{ nm}$ (Figure 124(b)). [309] Seule sa forme basique est fluorescente. [314] Elle est très peu soluble dans l'eau (6,4 mg/L [310]) et a été étudiée dans le méthanol, solvant dans lequel elle est le plus soluble. Sa constante de Henry est de $H_{\text{cc}} = 3,3\cdot 10^{-6}$. [313] Une détection en phase gaz peut donc être envisagée à condition que son rendement quantique de fluorescence soit suffisamment élevé.

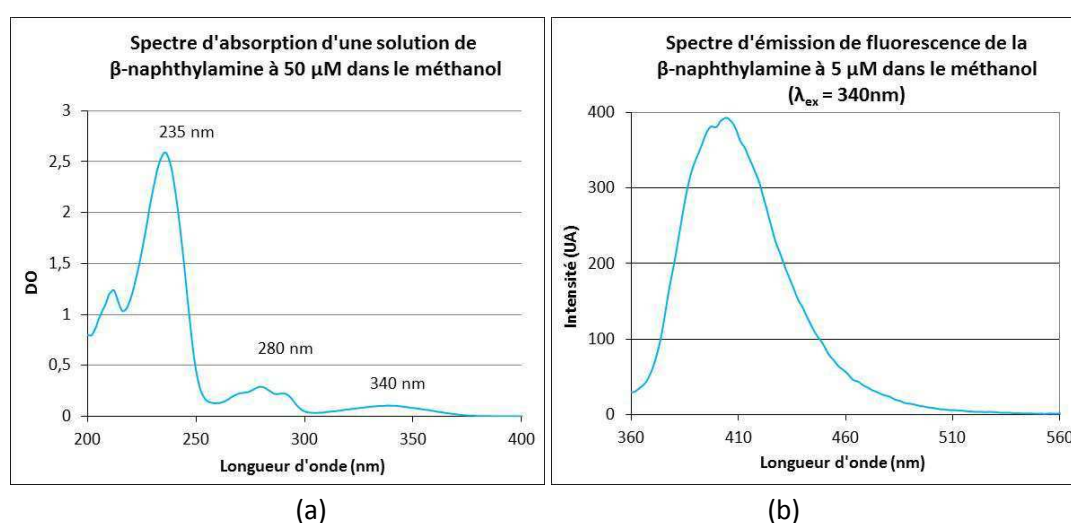


Figure 124 : Etude de la β -naphthylamine dans le méthanol. (a) Spectre d'absorption ; (b) Spectre d'émission de fluorescence.

Le rendement quantique de fluorescence de la β -naphthylamine a été déterminé dans le méthanol en utilisant la quinine sulfate dihydrate comme molécule de référence (Annexe 8.3). Il vaut $\phi = 0,29 \pm 0,03$, ce qui est intéressant pour une détection en fluorescence. Cette valeur est un peu inférieure aux valeurs de la littérature (Tableau 35).

Rendement quantique de fluorescence $\phi_{(\beta\text{-NA})}$	Solvant	Référence
0,33	Cyclohexane	315
0,46	Ethanol	315
0,32	n-heptane	314
0.66	eau	314
$0,29 \pm 0,03$	méthanol	nos résultats

Tableau 35 : Valeurs de rendement quantique de fluorescence de la β -NA dans différents solvants.

III.2.2. Synthèse de monolithe et exposition à la β -naphthylamine

La formule de sol utilisée dans la préparation de monolithes pour la détection de β -naphthylamine en phase gazeuse est la même que celle utilisée pour la détection du pNP. Le monolithe utilisé ici a été préparé avec 6% d'APTES (Annexe 9.2). Du fait de l'incorporation de précurseur aminopropyl-triéthoxysilane, la β -naphthylamine, une fois captée dans le monolithe, est maintenue sous sa forme basique qui est la plus fluorescente.

Un monolithe a été exposé à 107 ppm de β -NA pendant 24 heures (Figure 125(a), Annexe 11.4) dans le montage schématisé en Figure 125(b). Lorsqu'il est excité à 365 nm grâce à une lampe UV normalement destinée à la révélation de plaque de chromatographie sur couche mince (CCM), celui-ci montre une fluorescence bleue. Cette observation est en accord avec la littérature qui annonce que la β -NA émet de la fluorescence à 410 nm. [309, Figure 124]

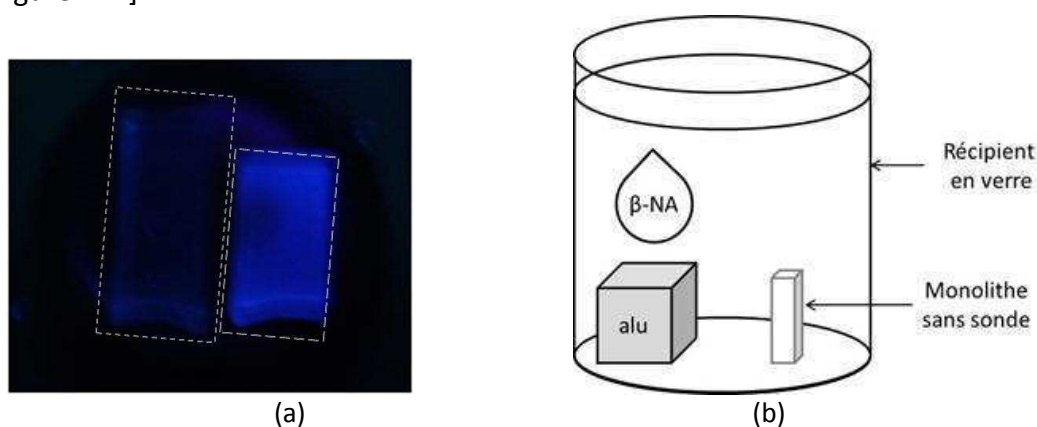


Figure 125 : (a) Photo de deux monolithes exposés à une lampe UV ($\lambda_{\text{ex}} = 365 \text{ nm}$) : celui de gauche n'a pas été exposé à la β -NA et n'est pas fluorescent ; celui de droite a été exposé pendant 24 heures à 107 ppm de β -NA et en a piégé une partie, ce qui le rend fluorescent ; (b) Schéma du montage d'exposition

Des films de matériau poreux supportés par des lames en verre sont également préparés. Il est recommandé de travailler en couche mince lors de la détection en fluorescence afin d'éviter tout phénomène d'absorption des photons émis en fluorescence dû à l'épaisseur du support.

Les films sont réalisés par spin-coating. Pour cela, le rapport molaire de la formule du sol est modifié. La proportion de méthanol est diminuée : TMOS/APTES/MeOH/eau : 1/0,03/4/4. 500 μL de sol sont déposés sur une lame de microscope en verre, elle-même fixée sur un appareil de spin-coating. Après une minute à 1000 tours/minute, le sol s'est étalé sur la lame et a gelé puis séché. La lame est ensuite exposée à 110 ppm de β -NA pendant 24 heures dans le montage schématisé en Figure 125(b).

Le film capte la β -NA et il est possible d'en détecter l'émission de fluorescence à partir d'1h45 d'exposition (Figure 126).

L'analyse en émission de fluorescence est réalisée avec un spectrofluorimètre PERKIN ELMER LS 50 B équipé d'une lampe à Xénon. Les fentes d'émission et d'excitation sont réglées à 3 nm (ouverture minimale). Le film mince est placé de telle sorte que le faisceau

d'excitation arrive sur l'échantillon avec un angle de 45°. La détection de l'émission de fluorescence est effectuée en mode « right angle » (RA). Elle est non seulement plus simple à mettre en œuvre (monolithe ou film mince sans molécule sonde) mais aussi plus sensible et permet la détection de 110 ppm de β -NA en moins de deux heures.

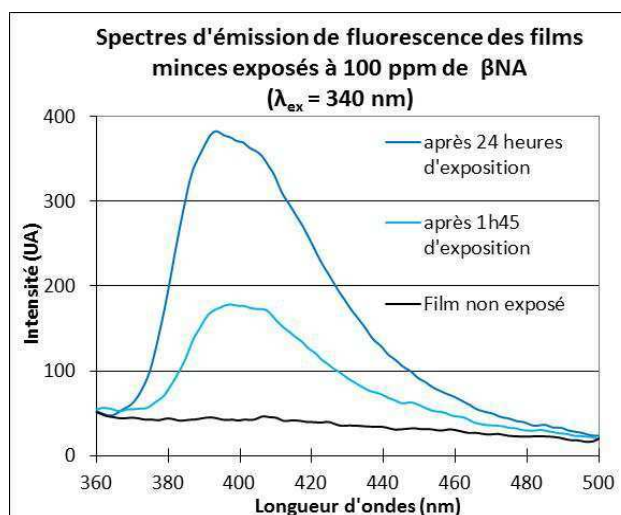


Figure 126 : Spectres d'émission de fluorescence d'un film mince de sol-gel exposé à 110 ppm de β -NA et excité à $\lambda_{ex} = 340$ nm.

IV. Conclusion

Nous avons cherché à illustrer le concept de substrats osmogènes libérant des mCOV exogènes, qui seront détectés dans la phase gazeuse avec des capteurs nanoporeux. Deux voies enzymatiques conduisant à la libération d'un mCOV ont été étudiées : l'activité β -D-glucuronidase, caractéristique de *E. coli* et l'activité L-alanine- β -naphthylamide, présente chez de nombreuses bactéries. En présence de l'enzyme adéquate, les mCOV exogènes libérés sont respectivement le p-nitrophénol (pNP) et la β -naphthylamine (β -NA). Diverses stratégies ont été développées pour l'élaboration des capteurs colorimétriques ou fluorimétriques, selon les propriétés optiques des mCOV-cible.

Dans un premier temps, l'étude en solution des propriétés optiques du pNP et de la β -NA a été réalisée. Elle a permis de montrer qu'une voie de détection directe est possible pour les deux mCOV cibles. En effet, la forme basique du pNP (pNP^-) est suffisamment absorbante à 400 nm ($\epsilon_{400nm} = 18000 \pm 880 \text{ mol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) pour permettre une mesure directe en absorption. De même, la β -NA, composé fluorescent ($\lambda_{ex} = 335$ nm, $\lambda_{ém} = 410$ nm, $\phi_{\beta-NA} = 0,29 \pm 0,03$) possède un rendement quantique de fluorescence élevé et peut être détectée directement en fluorescence. Pour cette dernière, une dérivation chimique avec le diméthyl-p-aminocinnamaldéhyde (DMACA) a été également envisagée pour la mise au point d'un capteur colorimétrique. En effet, le produit de la réaction entre le DMACA et la β -NA présente une bande d'absorption très intense et centrée autour de 540 nm ($\epsilon_{540nm} = 47\,000 \pm 2900 \text{ mol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$). Les conditions optimales de réaction entre le DMACA

et la β -NA en solution éthanolique ont été déterminées et les conditions retenues avec DMACA 2 mM et HCl 0,5 M permettent la protonation de DMACA et l'obtention d'un bon rendement de réaction.

La capacité de libération du mCOV par des bactéries a ensuite été mise à l'épreuve en milieu biologique. Un milieu contenant le substrat osmogène 4-nitrophényl- β -D-glucuronide (114 μ M) a été inoculé avec différentes souches de bactéries. Un suivi spectrophotométrique du milieu de culture filtré a montré la sélectivité de ce substrat. Seules les deux souches d'*E. coli* étudiées, capables de produire l'enzyme β -D-glucuronidase, ont libéré le pNP. Une concentration maximale de 70 μ M de pNP est détectée en phase liquide. Les autres souches étudiées sont β -D-glucuronidase négatives et ne libèrent pas de pNP.

La sélectivité du substrat osmogène L-alanine- β -naphthylamide vis-à-vis des bactéries à gram positif a également été mise à l'épreuve. Ce substrat a été inoculé avec des souches de bactéries à Gram positif ou négatif et avec un eucaryote. Pour toutes ces souches, la présence de β -naphthylamine libérée et révélée par la formation d'un composé rouge avec le DMACA, indique que l'activité L-alanine- β -naphthylamidase n'est pas spécifique des bactéries à Gram positif.

Après avoir démontré la libération des mCOV exogènes en milieux liquides et biologiques, nous avons cherché à détecter la présence de pNP et β -NA en phase gazeuse à l'aide de capteurs nanoporeux à base de silicates Avec des matrices hydrophyles contenant une fonction aminopropyle, permettant l'obtention d'un pH intrapore adéquat pour piéger pNP sous sa forme basique, nous avons montré que les capteurs nanoporeux agissent comme des éponges en déplaçant l'équilibre gaz/liquide d'une solution de pNP et peuvent ainsi piéger de grande quantité de pNP. En milieux biologiques, les résultats obtenus pour la détection de p-nitrophénol libéré par *Escherichia coli* dans divers milieux tamponnés à l'acide 3-(N-morpholino)propanesulfonique (MOPS) et l'acide 3-morpholino-éthanesulfonique (MES) sont peu reproductibles. Il faut cependant noter que les concentrations attendues de pNP dans la phase gazeuse sont de l'ordre de la centaine de ppb et que des molécules d'eau (25000 ppm), et probablement d'autres COV, provenant du milieu osmogène peuvent entrer en compétition avec le pNP pour s'adsorber à la surface des pores du monolithe. Cette compétition est d'autant plus importante que la durée d'incubation sera longue.

Avec la β -naphthylamine, une première stratégie de détection est la dérivation avec le DMACA. Avec le capteur nanoporeux mis au point, une variation d'absorbance est déjà mesurable lorsque 2 nmol de composé azo sont formées dans la matrice. On soupçonne que plus de 2 nmol de β -NA sont adsorbées dans la matrice et que le rendement de la réaction intrapore est faible. En effet, seuls 1,6% de la β -NA présente dans la phase gazeuse sont détectés. Les conditions de synthèse doivent encore être améliorées pour l'obtention d'un environnement intrapore favorable à la réaction. La seconde stratégie de détection directe

par fluorimétrie appliquée à la β -naphtylamine piégée dans une matrice poreuse, ayant la forme d'un film mince, a donné des résultats fort encourageants. Un signal de fluorescence est détecté dès 1h45 d'exposition à 110 ppm de β -NA. Les travaux doivent être poursuivis en milieu biologique pour évaluer l'influence de l'humidité sur le rendement de piégeage de β -NA.

Plusieurs suggestions d'amélioration peuvent être proposées pour surmonter les problèmes que nous avons rencontrés, tels que l'inhomogénéité de piégeage du capteur ou encore sa sensibilité à l'humidité. L'inhomogénéité de la répartition de la molécule sonde est due à la géométrie du monolithe et au processus lent de séchage. D'autres formes de monolithes favorisant un séchage plus rapide et plus homogène sont envisageables, comme des pastilles de faible épaisseur. Une réduction de la taille du monolithe permettrait également une meilleure diffusion des analytes volatils et un meilleur rendement de piégeage. L'utilisation de co-précurseurs hydrophobes permettrait l'obtention de capteurs plus hydrophobes et moins enclins à capter l'eau. Par ailleurs, des améliorations peuvent également être obtenues en changeant la nature des mCOV cibles. L'*o*-nitrophénol pourrait remplacer le pNP car bien qu'il soit moins absorbant ($\epsilon_{\text{oNP},410\text{nm}} = 3470 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, [316]), sa constante de Henry est meilleure que celle du pNP ($H_{\text{CC}} = 5,85\cdot 10^{-4}$, [302]). De même, l'*o*-cyanophénol, qui est un photoacide, peut être détecté en fluorescence sous sa forme déprotonée.

Conclusion générale

Les intoxications alimentaires et la sécurité sanitaire sont des problématiques qui ont toujours existé. Des méthodes permettant de détecter et d'identifier des pathogènes (*E. coli*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, ...) éventuellement présents dans un aliment existent déjà. Cependant, elles sont souvent chronophages et nécessitent l'intervention d'un technicien spécialisé. Il existe aujourd'hui une réelle demande en capteurs/détecteurs de pathogènes qui soient faciles à utiliser, transportables, sensibles, rapides et de faible coût. A l'heure actuelle, il existe un réel engouement pour la détection de pathogènes via la fraction volatile de leur métabolome et ce domaine de recherche reste entièrement ouvert.

C'est dans ce contexte que cette thèse se veut de proposer des solutions innovantes. Plusieurs objectifs sont visés. Le premier est d'élaborer des capteurs chimiques à transduction optique (colorimétrie, fluorescence) pour la détection en phase gazeuse de métabolites volatils caractéristiques de pathogènes comme *Salmonella*. Le second est d'apporter une preuve de concept d'une détection de l'activité enzymatique grâce à l'emploi de substrats osmogènes et de détecter en phase gazeuse les mCOV qui en sont issus avec des capteurs nanoporeux.

Pour répondre au premier objectif, nous avons élaboré des capteurs permettant de détecter deux métabolites volatils (mCOV) caractéristiques émis par *Salmonella* : le sulfure d'hydrogène (H_2S) et la cadavérine. Pour chacun des mCOV cibles, une molécule sonde est choisie et ses propriétés et réactivité sont tout d'abord étudiées en solution avant de transposer cette réaction dans une matrice nanoporeuse.

Une seule molécule sonde, la N,N-diméthylparaphénylènediamine (DMPD), a pu être utilisée en présence d'un oxydant, Fe^{3+} , pour la détection d' H_2S et d'un autre dérivé sulfuré, le méthaneithiol (MeSH). Elle permet de discriminer H_2S de MeSH en formant des produits de couleur différente, respectivement le bleu de méthylène (bleu, $\lambda_{abs} = 668$ et 750 nm) et, selon la quantité de MeSH présente, le 2-méthylthio-N,N-diméthyl-p-phénylènediamine (rouge, $\lambda_{abs} = 500$ nm) ou un produit de structure non encore élucidée (rouge-marron, $\lambda_{abs} = 422$ et 560 nm). L'étude en solution a montré que l'intermédiaire réactionnel « clé » de la formation du bleu de méthylène est la quinonediimine (QD), formée à partir de l'oxydation biélectronique de la DMPD. Grâce à l'emploi de diverses techniques de caractérisation complémentaires telles que la spectroscopie d'absorption, l'électrochimie, la spectroélectrochimie et la résonance paramagnétique électronique, le mécanisme très complexe de formation du bleu de méthylène a pu être élucidé dans un large domaine de pH et les sous-produits issus de l'hydrolyse de la QD ont pu être attribués et caractérisés spectralement. Ainsi, Qm_a dont le spectre d'absorption a été mis en évidence pour la première fois ($\lambda_{abs} = 220$ nm et 277 nm), est un composé transitoire issu de l'hydrolyse de la QD. Avec l'exploration de la réactivité de QD dans un large domaine de pH, nous avons montré qu'à des acidités peu étudiées dans la littérature telles que (HCl 2 M), la stabilité de

la QD est la plus élevée, soit 300 plus élevée qu'à pH = 1 et permet d'obtenir de bons rendements en bleu de méthylène.

Ces conditions sont transposées pour la synthèse de capteurs nanoporeux dopés de DMPD et de Fe^{3+} . Le capteur dopé avec $[\text{DMPD}] = 50\text{mM}$; $[\text{Fe}^{3+}] = 25\text{ mM}$ et $[\text{HCl}] = 2\text{ M}$ est capable de détecter 1000 ppm d' H_2S (couleur verte) et de MeSH (couleur marron). L'exposition simultanée à H_2S et MeSH montre que MeSH est préférentiellement détecté. Ce résultat est reproduit en milieu biologique, en présence de *Citrobacter freundii*, bactérie capable d'émettre à la fois H_2S et MeSH. L'eau est un interférent non négligeable qui entraîne la dégradation de la sonde en un composé vert clair, le Bindschedler's green ($\lambda_{\text{abs}} = 715\text{ nm}$). La répartition de la molécule sonde dans les pores de taille comprise entre 8 et 28 Å montre que la faible sensibilité du capteur vis-à-vis d' H_2S peut être expliquée par le faible nombre de pores « efficaces ». D'après nos calculs seuls 2,8% des pores contiennent au moins deux molécules sonde et 17,3% en contiennent au moins une. Deux perspectives sont proposées pour l'amélioration de la détection des sulfures : la première est de synthétiser des capteurs très acides (6 M HCl) dont le rôle est d'empêcher l'oxydation de la DMPD par les ions Fe^{3+} pendant le stockage du capteur. Le capteur serait ré-activé à l'emploi, par abaissement de l'acidité intrapore en présence de l'humidité générée par les cultures de bactéries. La seconde piste à explorer serait l'utilisation de précurseurs permettant d'agrandir la taille des pores afin d'augmenter le nombre de pores « efficaces »

La détection de la cadavérine est réalisée par formation d'un complexe fluorescent grâce à l'établissement de liaisons hydrogène avec la molécule sonde, le Naphthol AS-BI diméthylé (ArOH). Dans l'acétonitrile, solvant aprotique, le complexe absorbe à 433 nm et émet une fluorescence à 530 nm ($\phi_{\text{complexe,ACN}} = 0,075 \pm 0,02$). Son coefficient d'extinction molaire ($\epsilon_{\text{complexe,ACN}} = 2970 \pm 280\text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) et la constante d'association K_a ($K_a = 19900 \pm 1530\text{ M}^{-1}$) ont pu être déterminées par la méthode de Job. L'étude du complexe dans l'éthanol a mis en évidence l'interférence de ce solvant protique qui établit des liaisons hydrogène avec la molécule sonde. Cependant, l'étude en fluorescence a montré que les interactions avec la cadavérine restaient privilégiées et qu'une limite de détection en solution d'au moins 250 ppb pouvait être espérée. Les résultats obtenus sont encourageants. Les matrices hydrophobes contenant 10% de précurseur phényl-TMOS ont été synthétisées pour la détection de la cadavérine. Par manque de temps, ces matrices n'ont pas été exposées aux vapeurs de cadavérine. Ces études d'exposition devront être poursuivies, notamment en milieu très humide afin de connaître l'effet d'interférence de l'eau.

Pour atteindre le 2^{ème} objectif, nous avons illustré le concept de détection de l'activité enzymatique de la β -D-glucuronidase et de L-alanine- β -naphthylamidase en détectant avec des capteurs nanoporeux le p-nitrophénol (pNP) et la β -naphthylamine (β -NA) en phase gazeuse. Ce concept pourrait être adapté à la mise en évidence de C8 estérase, enzyme caractéristique de *Salmonella*. Le pNP, composé absorbant à 400 nm ($\epsilon_{400\text{nm}} = 18000 \pm 880\text{ mol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$), est détecté en absorbance. La β -NA est détectée à la fois par émission de fluorescence ($\lambda_{\text{ex}} = 335\text{ nm}$, $\lambda_{\text{ém}} = 410\text{ nm}$, $\phi_{\beta\text{-NA}} = 0,29 \pm 0,03$) et par

formation d'un composé azo rouge ($\lambda_{\text{abs}} = 540 \text{ nm}$; $\epsilon_{540\text{nm}} = 47\,000 \pm 2900 \text{ mol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) avec le diméthyl-p-aminocinnamaldéhyde (DMACA) introduit comme molécule sonde. La capacité d'une matrice poreuse sans sonde dopée avec de l'APTES à capter le pNP et la β -NA a été évaluée et a montré que 100 ppm de mCOV exogène pouvaient être détectés. L'utilisation d'une matrice dopée avec 2 mM de DMACA et 0,5 mM d'HCl permet aussi la détection de 100 ppm de β -NA mais la réaction avec le DMACA est incomplète. La formulation du monolithe dopé de DMACA est à améliorer pour favoriser la réaction intrapore.

La capacité de libération des mCOV par des bactéries a ensuite été évaluée en milieu biologique, avec le substrat osmogène 4-nitrophényl- β -D-glucuronide, spécifiquement métabolisé par les souches d'*E. coli*. Pour une raison inconnue, les bactéries ne consomment que 60% du substrat disponible dans le milieu de culture. Le pNP libéré a été mis en évidence en spectrophotométrie d'absorption à la fois en solution et dans la phase gazeuse par capture dans une matrice nanoporeuse. A ce jour, la reproductibilité des résultats obtenus pour l'exposition de matrices sans sonde à des milieux biologiques doit être améliorée. Le substrat L-alanine- β -naphthylamide a été introduit dans des milieux de culture gélosés inoculés avec des souches différentes. La présence de β -naphthylamine libérée, révélée par réaction avec le DMACA et formation d'un composé rouge, a montré que l'activité L-alanine- β -naphthylamidase n'est pas spécifique des bactéries à Gram négatif. Plusieurs suggestions d'amélioration concernant la mise au point du capteur sont proposées. L'utilisation de nouveaux précurseurs rendant la matrice hydrophobe représente une piste intéressante pour s'affranchir de l'humidité et favoriser l'adsorption de mCOV lors de l'exposition en milieu biologique. Une géométrie de forme circulaire est suggérée pour la mise en forme des monolithes afin de remédier à l'inhomogénéité de la répartition du DMACA dans la matrice poreuse et de permettre une diffusion plus rapide des mCOV dans les pores. Un nouveau support permettant d'éclairer la totalité du capteur lors de l'acquisition des spectres d'absorption ou d'émission de fluorescence permettrait d'obtenir des mesures plus précises.

Les travaux réalisés pendant cette thèse ont permis de sélectionner les molécules sondes adéquates permettant la détection d' H_2S , de MeSH et de cadavérine. Les études en solution ont permis de comprendre les phénomènes mis en jeu lors de la détection et d'identifier les meilleures conditions de stabilité et de réactivité à transposer pour la préparation de capteurs poreux. L'exposition en phase gazeuse en milieu biologique a mis en évidence les paramètres à prendre en considération pour l'amélioration de ces capteurs et augmenter leur sensibilité (interférent, dopage en molécule sonde, synthèse sous argon). Les perspectives en cette fin de thèse s'orientent principalement vers un travail sur la matrice poreuse elle-même. La taille des pores et leurs propriétés physico-chimiques devront être optimisées avec l'incorporation de nouveaux précurseurs alcoxy-silanes fonctionnalisés. Une modification de la mise en forme du capteur (monolithe, film) et du montage de détection optique devra également faire l'objet d'une étude pour récupérer la totalité du signal de détection.

L'obtention de capteurs réagissant spécifiquement avec les sulfures, la cadavérine et des mCOV ciblés constituent les premières briques pour la construction d'un nez colorimétrique pour la détection de pathogènes.

ANNEXES

Annexes

Annexe 1 : Multiplication bactérienne	187
Annexe 2 : Taxonomie	188
Annexe 3 : Distinction GRAM+/GRAM-	190
Annexe 4 : Définition d'un composé organique volatil et constante de Henry	191
Annexe 5 : Spectres d'absorption des versions commerciales des sous-produits de l'oxydation de la DMPD	193
Annexe 6 : Détermination des coefficients d'extinction molaire	194
Annexe 6.1. FeCl ₃ et FeCl ₂	195
Annexe 6.2. Diode dans l'eau	195
Annexe 6.3. Détermination du coefficient d'extinction molaire du bleu de méthylène en monolithe	196
Annexe 6.4 : Détermination des coefficients d'extinction molaire de la molécule sonde (Ar-OH) et de l'analyte (cadavérine).	197
Annexe 7 : Définition d'un point isobestique	198
Annexe 8 : Détermination de rendement quantique de fluorescence	198
Annexe 8.1. Bleu de méthylène	198
Annexe 8.2 : Détermination du rendement quantique de fluorescence du complexe, en utilisant la quinine sulfate dihydrate comme référence.....	199
Annexe 8.3 : Détermination du rendement quantique de fluorescence de la β-naphthylamine	200
Annexe 9 : Synthèse de capteurs par voie sol-gel	200
Annexe 9.1 : Synthèse de monolithes pour la détection d'H ₂ S et MeSH	200
Annexe 9.2 : Synthèse de capteurs pour la détection de p-nitrophénol et de β-naphthylamine	201
Annexe 10 : Détermination de la surface spécifique d'un solide poreux par adsorption d'azote (Méthode de Brunauer, Emmett et Teller dite BET)	204
Annexe 10.1 : Théorie	204
Annexe 10.2 : Caractérisation BET d'un monolithe sans sonde dopé à 3% d'aminopropyltriéthoxysilane (APTES).....	206
Annexe 11 : Protocoles d'exposition de capteurs	207
Annexe 11.1 : Exposition à H ₂ S et MeSH.....	207
Annexe 11.2 : Exposition de monolithes au p-nitrophénol à partir d'une solution éthanolique	209
Annexe 11.3 : Exposition de monolithes au p-nitrophénol à partir d'une solution aqueuse	209
Annexe 11.4 : Exposition de monolithes à la β-naphthylamine à partir d'une solution éthanolique	210
Annexe 12 : Réponse colorimétrique des monolithes exposés à H₂S	210
Annexe 13 : Synthèse de la molécule sonde Naphthol AS-BI déméthylé	211
Annexe 14 : Description de la méthode de Job utilisée pour la détermination de la stœchiométrie du complexe Naphthol AS-BI déméthylé/cadavérine dans l'acétonitrile. ..	214

Annexe 15 : Génération de mCOV exogènes en milieu biologique, composition des milieux osmogènes	215
Annexe 15.1 : Génération de p-nitrophénol	215
Annexe 15.2 : Génération de β -naphthylamine.....	216
Références bibliographiques.....	218

Annexe 1 : Multiplication bactérienne

Les bactéries sont des micro-organismes vivants. Lorsqu'elles trouvent les éléments nutritifs suffisants et que les conditions environnementales (température, pH, activité de l'eau) s'y prêtent, elles se multiplient par division cellulaire. Le phénomène de croissance des bactéries comporte plusieurs phases (Figure 127). [3]

La phase de latence (☐) suit immédiatement l'ensemencement du microbe dans le milieu de culture. Au cours de cette phase, il n'y a pas de division cellulaire. Il s'agit d'une période d'adaptation au cours de laquelle la bactérie synthétise, entre autres, les enzymes qui lui sont nécessaires pour métaboliser les substrats présents (adaptation enzymatique ou phénomène d'induction) et répare les dommages subis par un stress extérieur (température, stress oxydatif, salinité, antibiotiques). La durée de cette phase dépend du nombre de bactéries étalées sur le milieu, du milieu lui-même et de leur état physiologique.

La phase de départ (☐) correspond à la fin de la phase de latence, lorsque les bactéries commencent à se multiplier. Elle est suivie de la **phase exponentielle de croissance** (☐) pendant laquelle un taux de croissance élevé est observé. Lorsque la concentration cellulaire est exprimée en échelle logarithmique en fonction du temps, cette phase est représentée par une droite. Tout au long de cette phase, le temps de génération de la bactérie (temps de doublement de la population microbienne) est constant.

Lorsque la quantité de nutriments dans le milieu commence à s'épuiser, les bactéries se divisent moins rapidement : c'est la **phase de ralentissement** (☐). Conséquences de l'activité bactérienne, les produits issus de leur métabolisme sont nombreux et certains d'entre eux peuvent avoir une action inhibitrice.

Pendant la **phase stationnaire** (☐), les bactéries ne se divisent plus, la concentration en cellules reste constante. Les bactéries se contentent de survivre dans le milieu.

Pour terminer, la concentration en cellules viables diminue progressivement du fait de l'augmentation du taux de mortalité (**phase de décroissance** ☐).

Les bactéries peuvent être cultivées en milieux liquides ou gélosés. Les milieux liquides sont souvent utilisés pour l'enrichissement afin d'augmenter la population de bactéries tandis que les milieux gélosés servent à isoler une culture pure de bactérie. Une cellule unique se multipliant sur un milieu gélosé va, au bout de 24 à 48 heures devenir un amas de cellules visible à l'œil nu appelé **colonie**. Les concentrations de cellules s'expriment en **cfu/mL** (colony forming unity) ou **ufc/mL** (en français, unité formant colonie) qui correspond au nombre de cellules viables pouvant former une colonie.

[3] Jean-Yves Leveau, Marielle Bouix, Jean-Paul Larpent, **Sécurité microbiologique des procédés alimentaires**, *Techniques de l'ingénieur*, f1120.

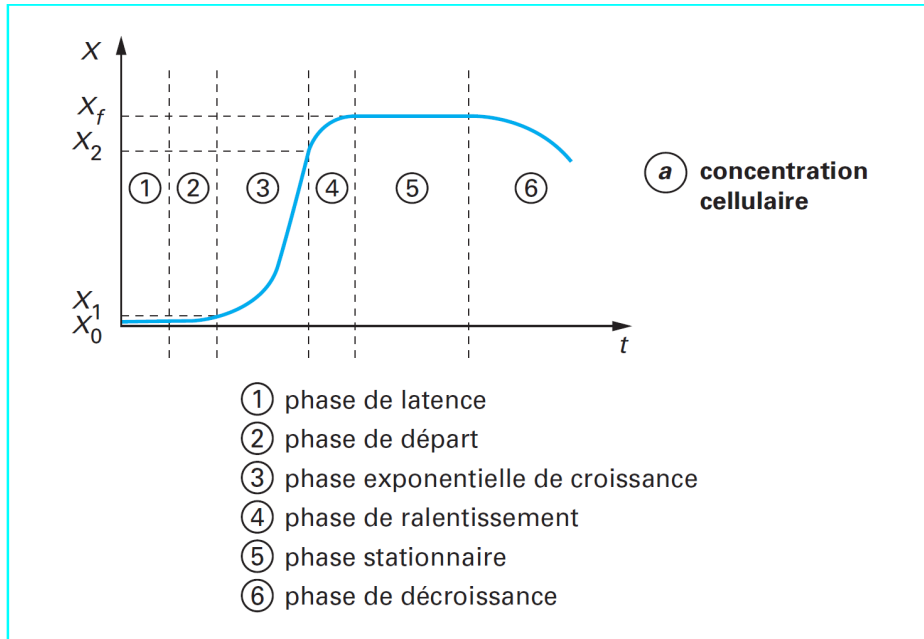


Figure 127 : La multiplication bactérienne se décompose en 5 phases distinctes. La concentration en cellules bactériennes, X, est tracée en fonction du temps de culture. [3]

Annexe 2 : Taxonomie

La taxonomie est la classification des organismes vivants. Trois grands domaines distinguent les organismes vivants en archaebactéries, bactéries et eucaryotes. Le **domaine** des bactéries est ensuite subdivisé en différents groupes créant ainsi un système hiérarchique qui regroupe les individus présentant des caractères communs (Figure 128).

Règne : *Prokaryote*
 Domaine : *Bacteria*
 Phylum : *Proteobacteria*
 Classe : *Gammaproteobacteria*
 Ordre : *Enterobacteriales*
 Famille : *Enterobacteriaceae*
 Genre : *Escherichia*
 Espèce : *Escherichia coli*
 Souche : ATCC 11775

Figure 128 : Exemple de la taxonomie d'une souche d'*Escherichia coli* employée dans nos expériences.

L'**espèce** est le plus petit échelon hiérarchique. Les espèces sont définies par des caractères phénotypiques comme la morphologie ou le métabolisme. Cependant, au sein d'une même espèce, il peut exister des variations de caractères (biochimiques, antigéniques ou de sensibilité aux antibiotiques) insuffisamment importantes pour former une nouvelle espèce. Les bactéries présentant ces variations sont alors appelées **souche**. La taxonomie permet de classer et de nommer les différentes souches bactériennes. Le Tableau 36 décrit les souches utilisées pendant la thèse.

Tableau 36 : Taxonomie et description de la paroi des différentes bactéries utilisées pendant la thèse.

Règne	<i>Procaryote</i>	<i>Procaryote</i>	<i>Procaryote</i>	<i>Procaryote</i>	<i>Procaryote</i>	<i>Procaryote</i>
Domaine	<i>Bacteria</i>	<i>Bacteria</i>	<i>Bacteria</i>	<i>Bacteria</i>	<i>Bacteria</i>	<i>Bacteria</i>
Phylum	<i>Protéobacteria</i>	<i>Protéobacteria</i>	<i>Protéobacteria</i>	<i>Protéobacteria</i>	<i>Protéobacteria</i>	<i>Protéobacteria</i>
Classe	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>
Ordre	<i>Enterobacteriales</i>	<i>Enterobacteriales</i>	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Enterobacteriales</i>	<i>Enterobacteriales</i>	<i>Enterobacteriales</i>
Famille	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>
Genre	<i>Escherichia</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Citrobacter</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Hafnia</i>
Espèce	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Hafina alvei</i>
Souche	ATCC 11775	ATCC 13047	ATCC 12633	ATCC 8090	ATCC 35421	ATCC 13337
Gram	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif

Les différentes souches portent un nom ATCC délivré par l'*American Type Culture Collection* qui est une société privée américaine. [4] Cette société possède une grande diversité de ressources biologiques (bactéries, virus, champignons et levures) de référence. Elle s'assure de l'authentification des souches et se charge de les conserver et de les vendre aux chercheurs du monde entier.

Annexe 3 : Distinction GRAM+/GRAM-

Les bactéries sont des cellules procaryotes, c'est-à-dire que leur ADN est libre dans le cytoplasme et non contenu dans un noyau. La paroi cellulaire est une enveloppe qui maintient le contenu de la cellule et la protège de l'environnement extérieur. Il est possible de distinguer les bactéries à Gram positif des bactéries à Gram négatif d'après la composition de leur paroi cellulaire (Figure 129). La simple paroi des bactéries à Gram positif contient une grande quantité de polymères appelés peptidoglycanes. La paroi des bactéries à Gram négatif contient moins de peptidoglycanes et est recouverte d'une membrane externe supplémentaire. La différence de structure entre ces deux types de paroi est mise en évidence par le test de Gram qui consiste à teinter les cellules avec différents colorants. [5]

Le test de Gram est composé de 3 étapes :

- Dans un premier temps, **les cellules sont colorées avec du violet de gentiane** pendant une minute. Ce colorant présente des affinités avec les composants du cytoplasme ; par conséquent **les cellules se colorent en bleu-violet quelle que soit le type de paroi**. Après rinçage à l'eau déminéralisée, une solution d'iode-iodurée (Iugol) est étalée sur les cellules pour « fixer » la couleur. Après une minute, les cellules sont à nouveau rincées à l'eau déminéralisée.

- Dans un deuxième temps, une décoloration est réalisée par rinçage avec de l'éthanol à 95% ou un mélange éthanol-acétone. **Les bactéries à Gram négatif sont décolorées** car leur paroi laisse passer l'alcool et permet le rinçage du violet de gentiane. Au contraire, la paroi riche en peptidoglycanes des bactéries à Gram positif ne laisse pas passer l'alcool et par conséquent, ces cellules ne sont pas décolorées : **le cytoplasme des bactéries à Gram positif reste violet**.

- Pour terminer, une recoloration à la fuschine ou à la safranine est réalisée. Cette étape permet de recolorer les cellules en rouge. La teinte bleu-violet des cellules à Gram positif n'est pas affectée par la couleur rouge de la fuschine car le spectre du violet de gentiane absorbe dans le même domaine de longueur d'onde que la fuschine. **Les bactéries à Gram**

[4] <http://www.lgcstandards-atcc.org/Home/tabid/477/Default.aspx>

[5] <http://bacterioblog.over-blog.com/article-12387707.html>

négatif seront, quant à elles, colorées en rouge et pourront être observées au microscope optique.

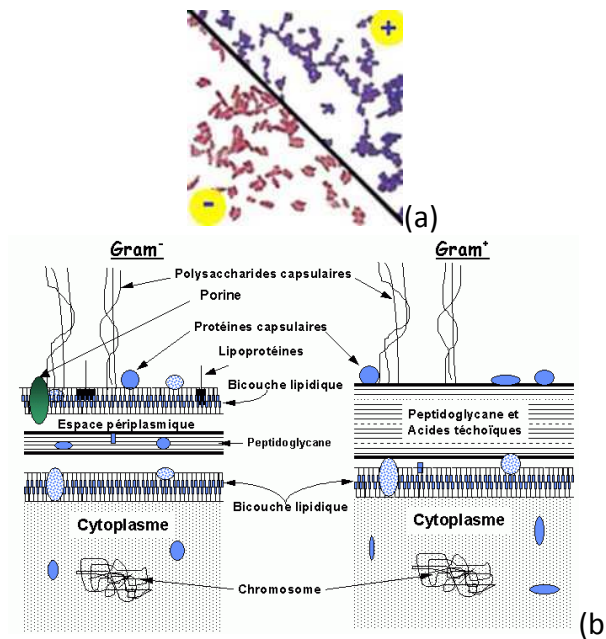


Figure 129 : (a) Différence de coloration des bactéries à Gram négatif et Gram positif ; (b) différence de structure entre les parois des bactéries à Gram négatif (gauche) et à Gram positif (droite). [6]

Annexe 4 : Définition d'un composé organique volatil et constante de Henry

La directive européenne n° 1999/13/CE du conseil du 11 mars 1999 [7] définit par le terme de composé organique volatil (COV) « tout composé organique ayant une pression de vapeur de 0,01 kPa ou plus à une température de 293,15 K ou ayant une volatilité correspondante dans les conditions d'utilisation particulières d'utilisation particulières ».

La **loi de Henry** est la loi qui régit la répartition du COV entre la phase aqueuse et la phase gaz. Cette loi détermine, pour un composé hydrosoluble et volatil, le **coefficient de partition à l'équilibre** entre la solution aqueuse diluée et la phase gaz. Si $C_{i,L}$, est la concentration volumique du composé volatil i dans la phase aqueuse (en g/m^3 ou en mol/m^3) et $C_{i,G}$, sa concentration volumique dans la phase gaz (dans la même unité : g/m^3 ou mol/m^3), alors la constante de Henry est la grandeur sans dimension suivante:

$$H_{CC} = \frac{C_{i,G}}{C_{i,L}}$$

[6] http://www.unige.ch/cyberdocuments/theses2001/BisognanoC/these_body.html

[7] <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:31999L0013:fr:HTML>

Cette loi exprime que, pour un composé volatil donné, à une température et une pression données, on retrouve à l'équilibre toujours le même coefficient de partition entre les deux phases. Il est important de noter qu'il existe de nombreuses manières d'exprimer cette même loi, suivant la définition que l'on donne de la constante de Henry (Tableau 37). [8,9]

Des COV à forte constante présentent des valeurs de 5.10^{-2} et plus (jusque $\sim 10^2$), alors que des valeurs moyennes se situent plutôt autour de 5.10^{-4} à 5.10^{-2} et les valeurs faibles autour de 10^{-5} . [9,10] La constante de Henry dépend de paramètres tels que la salinité, le pH, la température de la phase aqueuse, ou encore la pression de la phase gazeuse. Les constantes de Henry de quelques COV sont regroupées dans le Tableau 38.

H_{CC} (sans dimension) $H_{CC} = \frac{C_{i,G}}{C_{i,L}}$	$C_{i,G}$: concentration en composé i dans φ_G (mol/L) $C_{i,L}$: concentration en composé i dans φ_L (mol/L)	Conversion $H_{CC} = \frac{12,2}{298,15 \cdot K_H}$ $H_{CC} = \frac{12,2}{298,15 \cdot \frac{55,3}{K_{H,x}}}$
K_H (M/atm) $K_H = \frac{C_{i,L}}{P_{i,G}}$	$C_{i,L}$: concentration en composé i dans φ_L (mol/L) $P_{i,G}$: pression partielle en composé i dans φ_G (atm)	Conversion $K_H = \frac{12,2}{298,15 \cdot H_{CC}}$ $K_H = \frac{55,3}{K_{H,x}}$
$K_{H,x}$ (atm/fraction molaire) $K_{H,x} = \frac{P_{i,G}}{x_{i,L}}$ S'écrit aussi : $P_{i,G} = K_{H,x} \frac{(1-x_i)n_i}{n_e}$	$P_{i,G}$: pression partielle en composé i dans φ_G (atm) $x_{i,L}$: fraction molaire du composé i dans φ_L (sans dimension) x_i : fraction molaire du composé i dans φ_G (sans dimension) n_i : nombre total de mol de composé i (φ_G + φ_L) (en mol) n_e : nombre total de mol d'eau dans la solution aqueuse (en mol)	Conversion $K_{H,x} = \frac{55,3 \cdot 298,15}{12,2} \cdot H_{CC}$ $K_{H,x} = \frac{55,3}{K_H}$

Tableau 37 : Description des constantes de Henry utilisées dans la littérature.

[8] J. Staudinger and P. V. Roberts, **A critical compilation of Henry's law constant temperature dependance relations for organic compounds in dilute aqueous solutions**, *Chemosphere*, **2001**, *44*, 561-576.

[9] R. Sander, **Compilation of Henry's Law Constants for Inorganic and Organic Species of Potential Importance in Environmental Chemistry (Version 3)**, 1999, <http://www.henrys-law.org>

[10] H.-P. Chao, **Volatilization characteristics of organic solutes in stirred solution**, *Journal of Environmental Management*, **2009**, *90*, 3422-3428.

Nom du composé	Structure du composé	Constante de Henry H_{cc}	Références
Benzène	C ₆ H ₆	1,91.10 ⁻¹	8
Dioxyde de carbone	CO ₂	1,2	9
Méthanol	CH ₄ O	1,37.10 ⁻⁴	8
		1,86.10 ⁻⁴	9
Ethanol	C ₂ H ₆ O	1,48.10 ⁻⁴	8
		2,15.10 ⁻⁴	9
Formaldéhyde	CH ₂ O	8,61.10 ⁻⁶	8
		1,36.10 ⁻⁵	9
		5,85.10 ⁻⁶	9
Indole	C ₈ H ₇ N	1,52.10 ⁻¹	11
		2,16.10 ⁻⁵	12
Tryptophane	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	8,1.10 ⁻¹³	12
Scatole	C ₉ H ₉ N	8,7.10 ⁻⁵	12
2' aminoacétophénone	C ₈ H ₉ N	1,4.10 ⁻⁷	12
Acétone	C ₃ H ₆ O	1.10 ⁻³	8
n-butylamine	C ₄ H ₁₁ N	7,1.10 ⁻⁴	12
Diméthyl sulfure	C ₂ H ₆ S	6,35.10 ⁻²	8
Diméthylsulfure	C ₂ H ₆ S ₂	3,18.10 ⁻²	8
Méthanethiol	CH ₄ S	1,23.10 ⁻¹	8
		1,05.10 ⁻¹	9
Sulfure d'hydrogène	H ₂ S	4,09.10 ⁻¹	9
4-nitrophénol (pNP)	C ₆ H ₅ NO ₃	1,57.10 ⁻⁸	9
		4,13.10 ⁻⁵	9
		1,36.10 ⁻⁶	9
		5,11.10 ⁻⁷	9
2-nitrophénol (oNP)	C ₆ H ₅ NO ₃	5,85.10 ⁻⁴	9
		5,53.10 ⁻⁴	9
		5,18.10 ⁻⁴	9
β-naphthylamine	C ₁₀ H ₉ N	3,3.10 ⁻⁶	12

Tableau 38 : Constantes de Henry de quelques COV. Notes : les valeurs issues de [9] et [12] ont été converties à l'aide du Tableau 37.

Annexe 5 : Spectres d'absorption des versions commerciales des sous-produits de l'oxydation de la DMPD

L'aminophénol et la benzoquinone sont dissous dans des solutions aqueuses à 0,1 M HCl et 2 M HCl à une concentration de 1 mM. Un volume d'ions ferriques (FeCl₃) est ensuite ajouté afin d'avoir une concentration à 500 μM de FeCl₃ (Figure 130 et Tableau 39).

[11] N. Ochiai, K. Sasamoto, A. Hoffmann and K. Okanoya, **Full evaporation dynamic headspace and gas chromatography–mass spectrometry for uniform enrichment of odor compounds in aqueous samples**, *Journal of Chromatography A*, **2012**, 1240, 59-68.

[12] US National library of medicine <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/chemidlite.jsp>

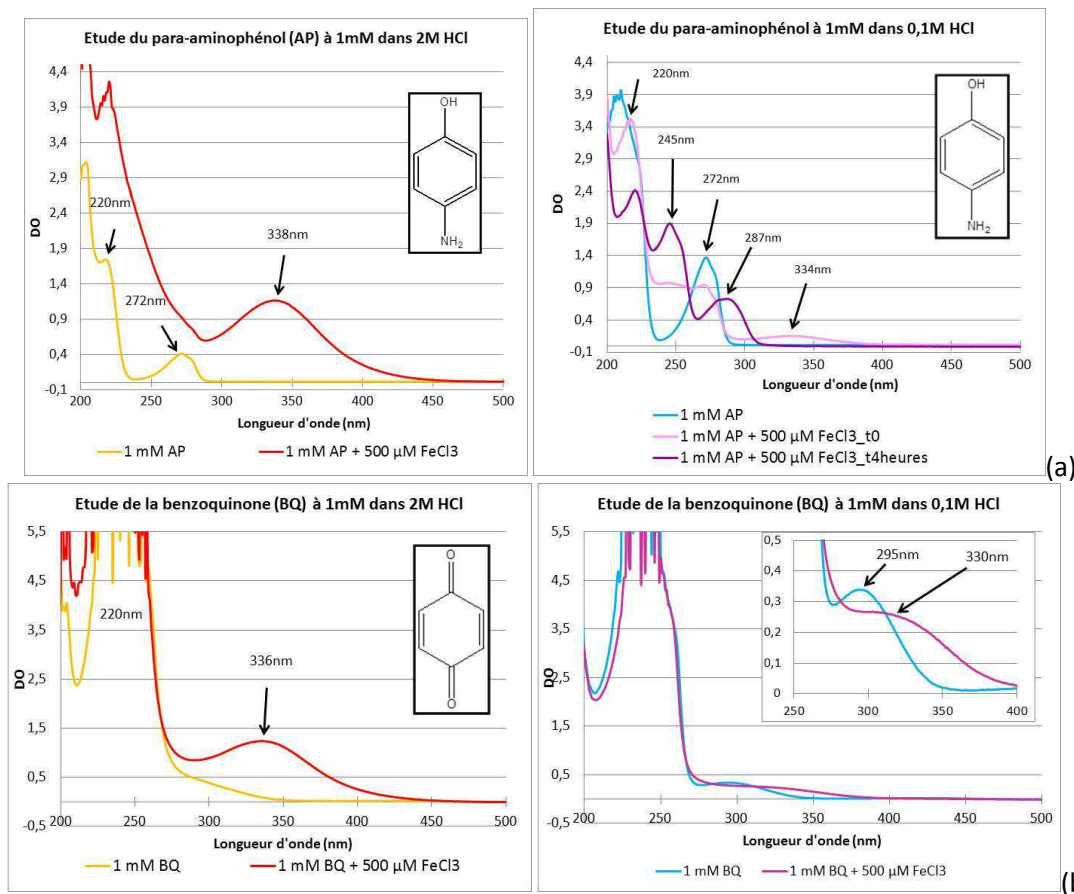


Figure 130 : Spectres d'absorption de (a) l'aminophénol à 1 mM dans 0,1 M HCl et 2 M HCl et de (b) la benzoquinone à 1 mM dans 0,1 M HCl et 2 M HCl.

Composés	pH=1		2M HCl	
	Avant oxydation par FeCl ₃	Après oxydation par FeCl ₃	Avant oxydation par FeCl ₃	Après oxydation par FeCl ₃
Aminophénol	220nm, 272nm	220nm, 245nm, 287nm	220nm, 272nm	220nm, 338nm
Benzoquinone	220nm, 295nm	220nm, 330nm	220nm	220nm, 336nm
FeCl ₃	224nm, 330nm		221nm, 340nm	
FeCl ₂	243nm, 332nm		248nm, 339nm	

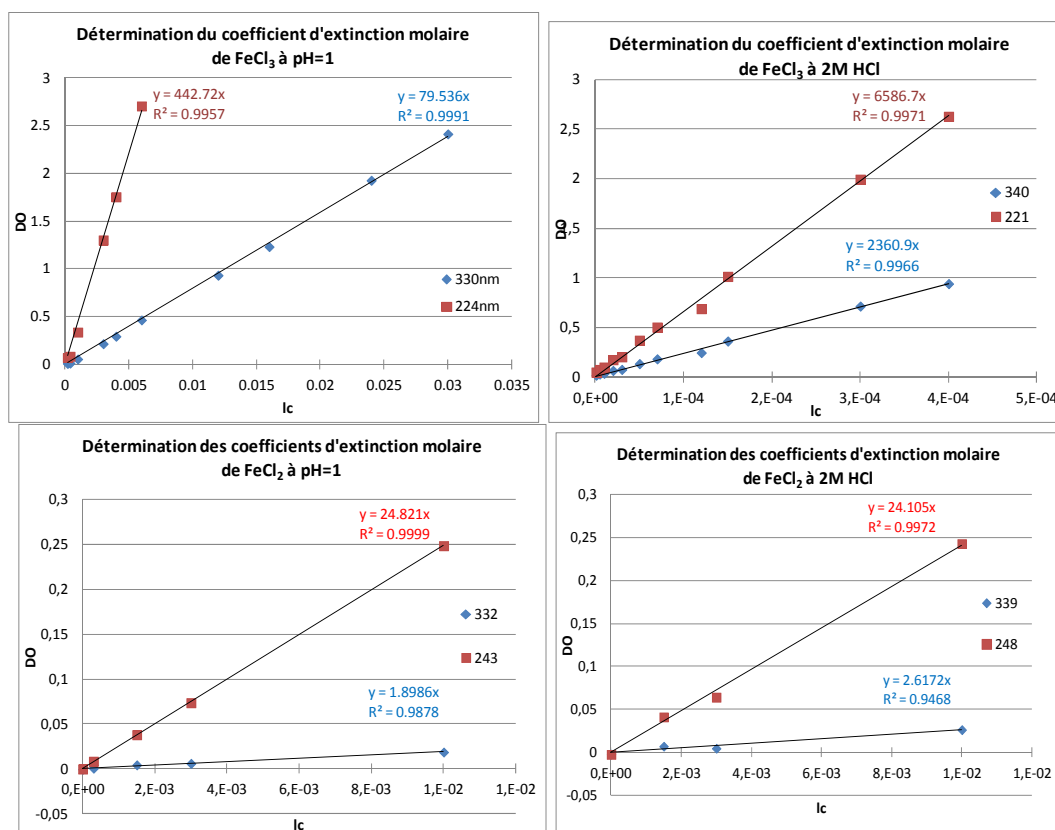
Tableau 39 : Tableau récapitulatif des maxima d'absorption de l'aminophénol et de la benzoquinone.

Annexe 6 : Détermination des coefficients d'extinction molaire

Plusieurs solutions sont préparées par dilution en cascade à partir d'une solution mère concentrée. Les spectres d'absorption UV-Visible de ces échantillons sont acquis puis les DO à la longueur d'onde d'intérêt sont reportées en fonction de $l \cdot c$ (l l'épaisseur de la cuve de spectroscopie multipliée par la concentration de l'échantillon). Une droite est obtenue dont la pente correspond au coefficient d'extinction molaire.

Annexe 6.1. FeCl_3 et FeCl_2

Les coefficients d'extinction molaire des ions ferriques FeCl_3 et des ions ferreux FeCl_2 sont déterminés graphiquement à pH = 1 et à 2 M HCl (Figure 131).



	FeCl_2	FeCl_3
pH=1	$\epsilon_{(243\text{nm})} = 24 \pm 0,5 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ $\epsilon_{(332\text{nm})} = 1,9 \pm 0,04 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$	$\epsilon_{(224\text{nm})} = 442 \pm 9 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ $\epsilon_{(330\text{nm})} = 80 \pm 2 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$
2M HCl	$\epsilon_{(248\text{nm})} = 24 \pm 0,5 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ $\epsilon_{(339\text{nm})} = 2,6 \pm 0,05 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$	$\epsilon_{(221\text{nm})} = 6600 \pm 140 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ $\epsilon_{(340\text{nm})} = 2360 \pm 50 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$

Figure 131 : Détermination graphique des coefficients d'extinction molaires des ions ferreux et ferriques dans des solutions aqueuses à 0,1 M HCl et 2 M HCl.

Annexe 6.2. Diode dans l'eau

Le coefficient d'extinction molaire du diode à 451 nm est déterminé : $\epsilon_{451\text{nm}} = 765 \pm 30 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ (Figure 132).

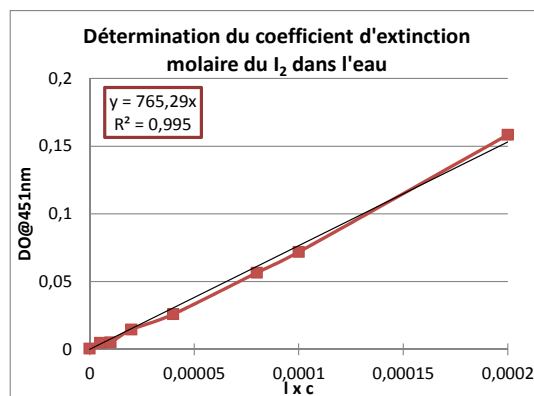


Figure 132 : Détermination du coefficient d'extinction molaire de I₂ à 451 nm en solution aqueuse.

Annexe 6.3. Détermination du coefficient d'extinction molaire du bleu de méthylène en monolithe

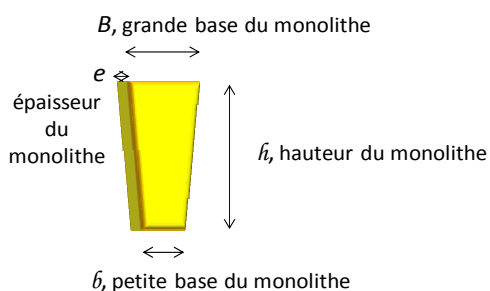
Le coefficient d'extinction molaire du bleu de méthylène a été déterminé en monolithe. Du bleu de méthylène commercial a été incorporé dans des matrices monolithes à 2M HCl. Huit formules de concentrations allant de 2,5 µM à 100 µM en MB ont été préparées. Pour chaque formule, environ 5 monolithes sont synthétisés.

Afin de calculer le coefficient d'extinction molaire du MB en monolithes, le spectre UV-visible des monolithes a été réalisé (un porte monolithe a été utilisé). La DO à 695 nm est ensuite reportée en fonction de $l \times c$, où l est l'épaisseur du monolithe et c , la concentration de MB en monolithe.

Les dimensions de chaque monolithe sont mesurées avec un pied à coulisse. La concentration en MB pour chaque monolithe est calculée en divisant le nombre de mol de MB introduit dans le sol (connu expérimentalement) par le volume du monolithe (calculé d'après les dimensions mesurées).

Les monolithes ont une forme évasée : la plus grande face n'a pas exactement la forme d'un rectangle mais plutôt celle d'un trapèze. Le volume du monolithe est donc

calculée en utilisant la formule : $V = \frac{(b + B)}{2} \times h \times e$.



Annexe 6.4 : Détermination des coefficients d'extinction molaire de la molécule sonde (Ar-OH) et de l'analyte (cadavérine).

Pour chaque composé, une dilution en cascade dans l'acétonitrile ou l'éthanol anhydre est réalisée (Figure 133). L'ensemble des valeurs des coefficients molaires sont regroupés dans le Tableau 40

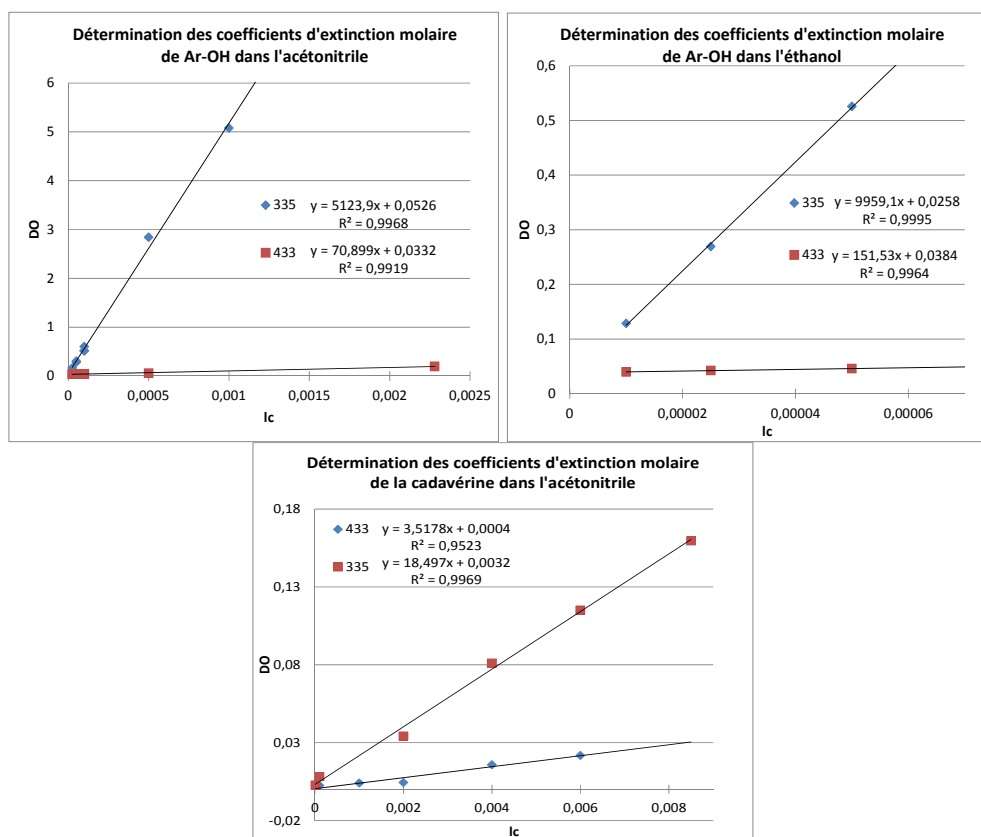


Figure 133 : Détermination des coefficients d'extinction molaire de la cadavérine et de la molécule sonde Naphthol ASBI déméthylé.

Ar-OH			
Acétonitrile		Ethanol	
335nm	433nm	335nm	433nm
5120 ± 45 L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹	71 ± 0,6 L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹	9960 ± 123 L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹	150 ± 2 L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹
Cadavérine			
Acétonitrile			
335nm	433nm		
18 ± 0,4 L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹	3,5 ± 0,08 L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹		

Tableau 40 : Récapitulatifs des valeurs de coefficients d'extinction molaire obtenus.

Annexe 7 : Définition d'un point isobestique

Par définition, au niveau du point isobestique de longueur d'onde λ_i , le coefficient d'extinction molaire est le même pour deux espèces en équilibre :

$$\varepsilon_A(\lambda_i) \stackrel{\text{déf}}{=} \varepsilon_B(\lambda_i)$$

Par exemple, l'absorbance A à la longueur d'onde λ d'une solution contenant deux espèces absorbantes A et B en équilibre ($A \rightleftharpoons B$) et de coefficients d'extinction molaire respectifs $\varepsilon_A(\lambda)$ et $\varepsilon_B(\lambda)$ s'écrit :

$$A(\lambda) = (\varepsilon_A(\lambda)c_A + \varepsilon_B(\lambda)c_B)l$$

où l est la longueur du chemin optique en cm.

Au point isobestique, soit à la longueur d'onde λ_i , l'absorbance peut s'écrire :

$$A(\lambda_i) = (c_A + c_B)\varepsilon_A(\lambda_i)l$$

où $c_A + c_B$ correspond à la concentration totale en espèces A et B.

La concentration totale en espèces A et B reste constante quelle que soit l'évolution de l'équilibre vers la formation de A ou de B. Par conséquent, l'absorbance à la longueur d'onde λ_i ($A(\lambda_i)$) reste la même quel que soit le rapport entre les espèces A et B.

Expérimentalement, la présence d'un point isobestique permet de mettre en évidence la présence de deux espèces en équilibre l'une avec l'autre ou l'évolution d'une espèce vers une autre (1 seule). A noter que si l'une des espèces est dégradée, le spectre d'absorption ne passe plus par le point isobestique.

Annexe 8 : Détermination de rendement quantique de fluorescence

Annexe 8.1. Bleu de méthylène

Le rendement quantique de fluorescence du MB^+ est déterminé dans l'eau MilliQ et dans l'éthanol en prenant pour référence la phtalocyanine de zinc tétrasulfonée (ZnPcTS) dissoute dans l'eau additionnée de 5% de pyridine. Dans ces conditions, le rendement quantique de fluorescence de $\Phi(\text{ZnPc TS}) = 0,32 \pm 0,03$ [13].

1) Dans un premier temps, des solutions diluées de bleu de méthylène et de ZnPcTS sont préparées. La DO des échantillons à la longueur d'onde d'excitation (600 nm) doit être inférieure à 0,05 pour éviter des phénomènes de réabsorption de la fluorescence, notamment lorsque les spectres d'absorption et de fluorescence présentent une zone de recouvrement non négligeable. Le tracé de la DO à 600 nm en fonction de l permet de vérifier que l'on se situe bien dans la zone de linéarité de la loi de Beer-Lambert.

[13] M. Richoux and A. Harriman, **Attempted photoproduction of hydrogen using sulphophthalocyanines as chromophores for three-components systems**, *Journal of The Chemical Society, Faraday Transactions II*, **1980**, 76, 1618-1626.

2) Dans un deuxième temps, les mêmes solutions sont étudiées en fluorescence en excitant à $\lambda = 600$ nm. L'aire sous la courbe de fluorescence est ensuite exprimée en fonction de la DO de la solution à la longueur d'onde d'excitation. Une droite est obtenue.

3) Le rendement quantique de fluorescence est calculé en comparant les pentes des droites ainsi obtenues (Figure 134).

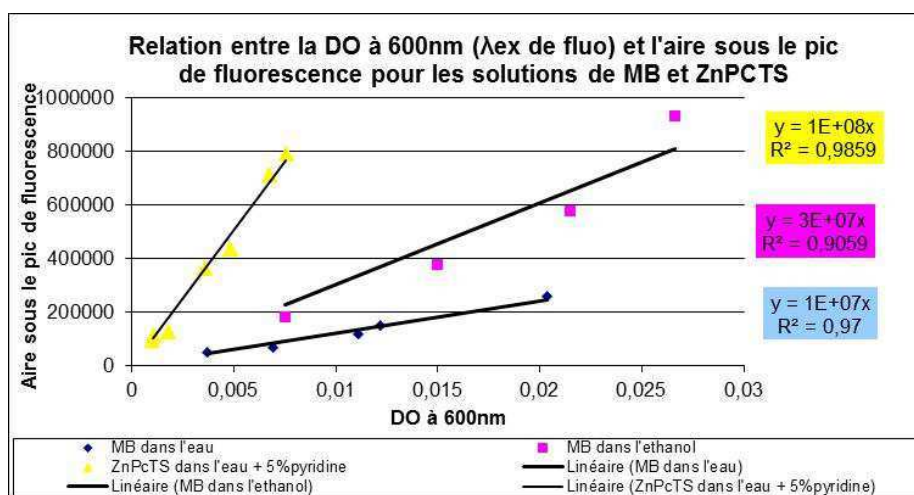


Figure 134 : Représentation de l'aire sous le pic de fluorescence en fonction de la DO à la longueur d'onde d'excitation. Une droite est obtenue pour la ZnPcTS et le MB dans l'eau et l'éthanol. La pente de ces droites est proportionnelle au rendement quantique de fluorescence.

La pente de la droite représentant l'aire sous le pic de fluorescence en fonction de la DO à la longueur d'onde d'excitation est proportionnelle au rendement quantique de fluorescence. Il est possible de déterminer les rendements quantiques de fluorescence du MB dans l'eau et l'éthanol, connaissant celui de la ZnPcTS ($0,32 \pm 0,03$).

- ✓ Rendement quantique du bleu de méthylène dans l'eau : $0,032 \pm 0,015$.
- ✓ Rendement quantique du bleu de méthylène dans l'éthanol : $0,1 \pm 0,04$

Annexe 8.2 : Détermination du rendement quantique de fluorescence du complexe, en utilisant la quinine sulfate dihydrate comme référence.

La méthode employée est la même qu'utilisée en Annexe 8.1. La molécule de référence est la quinine sulfate dihydrate (QS). Elle présente un rendement quantique de fluorescence de $\phi_{(QS, 349nm)} = 0,513 \pm 0,005$ lorsqu'elle est dissoute dans 0,05 M H_2SO_4 . [14] Le spectre d'émission de fluorescence est obtenu pour $\lambda_{ex} = 433$ nm. Le rendement quantique de fluorescence du complexe dans l'acétitrile anhydre vaut : $\phi_{(complexe, 433nm)} = 0,075 \pm 0,02$ (Figure 135).

[14] National Bureau of Standards, 1980, Special Publication 260-64, p.32.

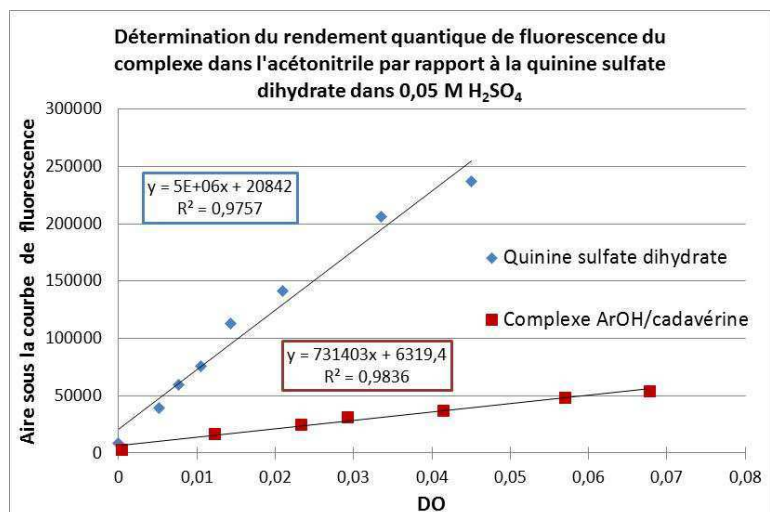


Figure 135 : Détermination du rendement quantique de fluorescence du complexe en traçant l'aire sous la courbe de fluorescence en fonction de la DO absorbée par l'échantillon à la longueur d'ondes d'excitation.

Annexe 8.3 : Détermination du rendement quantique de fluorescence de la β -naphthylamine

Le rendement quantique de fluorescence de la β -naphthylamine dans le méthanol est déterminé en utilisant la quinine sulfate dihydrate (QS) comme molécule de référence. Le spectre d'émission de fluorescence est obtenu pour $\lambda_{ex} = 340$ nm. Le rendement quantique de la β -naphthylamine vaut : $\phi = 0,29 \pm 0,03$ (Figure 136).

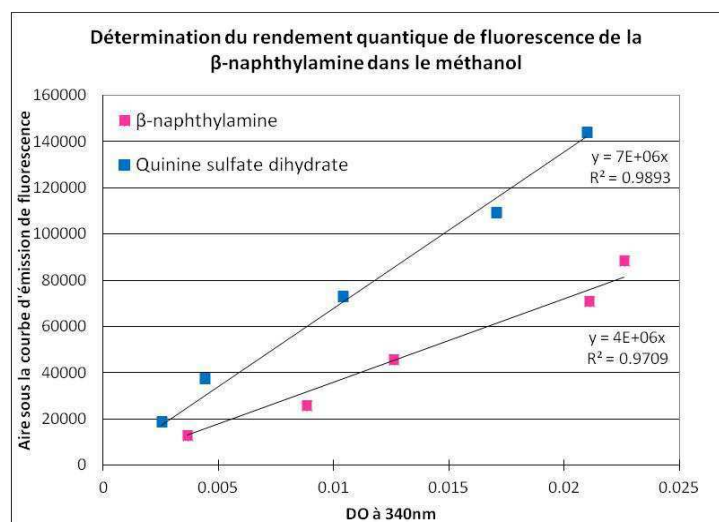


Figure 136 : Détermination du rendement quantique de fluorescence de la β -naphthylamine.

Annexe 9 : Synthèse de capteurs par voie sol-gel

Annexe 9.1 : Synthèse de monolithes pour la détection d'H₂S et MeSH

Protocoles de synthèse

Le sol utilisé pour la synthèse de capteurs contient du tétraméthylorthosilicate (CAS 681-84-5) pur à 98% de chez Fluka, de l'éthanol (CAS 64-17-5) de pureté

spectrophotométrique à 96% de chez Fluka, et de l'eau MilliQ. Les proportions entre le tétraméthylorthosilicate (TMOS), l'éthanol (EtOH) et l'eau suivent les ratios molaires suivants : 1/4/4. Pour 9,02 mL de sol, il faut donc incorporer 2,92 mL de TMOS, 4,66 mL d'EtOH et 1,44 mL d'eau. L'acide chlorhydrique (CAS 7647-01-0, noté HCl) à 37%, la N,N-diméthyl-para-phénylènediamine (CAS 536-46-9, notée DMPD)) et le chlorure de fer (III) (CAS 7705-08-0, noté FeCl₃) sont solubles dans l'eau. Ils sont incorporés dans les 1,44 mL d'eau.

Le TMOS et l'éthanol sont mélangés dans un premier temps. Puis le volume désiré de DMPD à 0,5M dans l'eau est introduit, suivi du volume désiré de FeCl₃ à 0,5M dans 0,267M HCl. La quantité d'eau restante pour atteindre 1,44 mL suit l'ajout d'HCl provoquant un échauffement du sol qui est agité le temps de refroidir. Pour les formulations fortement dopées en DMPD, il est nécessaire de dissoudre la DMPD dans l'éthanol plutôt que dans l'eau. La limite de solubilité de la DMPD dans l'éthanol est de 21 mM.

1 mL de sol est versé dans des cuves en plastique de spectroscopie (EVERGREEN référence 64198). Les cuves sont bouchées et laissées à température ambiante jusqu'à ce que le sol gèle. Au bout de 2 à 4 jours, lorsque le sol est gelé, le bouchon est retiré et remplacé par un film adhésif poreux (taille de pores : 10-50 µm, Greiner Bio-One, référence 676050) afin de commencer le séchage. Après 3 jours, ce film est remplacé par un film adhésif plus poreux pour accélérer le séchage (ThermoScientific, référence AB-0718). Au bout d'une semaine, tout l'alcool s'est évaporé : le monolithe est sec et peut être stocké à -20°C, sous argon, dans un flacon en verre.

Les formules préparées sont décrites au Tableau 41

Annexe 9.2 : Synthèse de capteurs pour la détection de p-nitrophénol et de β-naphthylamine

La formule de sol de référence utilisée pour la synthèse de capteurs sans sonde contient du tétraméthylorthosilicate (CAS 681-84-5) pur à 98% de chez Fluka, et 3% d'aminopropyltriméthoxysilane (CAS 13822-56-5) pur à 97 % de chez Aldrich, du méthanol (CAS 67-56-1) anhydre à 99,8 % de chez Sigma Aldrich, et de l'eau MilliQ. Les proportions entre le tétraméthylorthosilicate (TMOS), le méthanol (MeOH), l'aminopropyltriméthoxysilane (APTES) et l'eau suivent les ratios molaires suivants : 1/5/0,3/4. Pour 10,23 mL de sol, il faut donc incorporer 3,57 mL de TMOS, 4,86 mL de MeOH, 168 µL d'APTES et 1,728 mL d'eau.

Le TMOS et le méthanol sont mélangés dans un flacon en verre. Le mélange est ensuite amené à -20°C en plaçant le flacon dans un bain d'éthanol refroidi avec de l'azote liquide. L'APTES est ajouté. Si le bain est trop froid, l'APTES précipite. Pour terminer, l'eau est ajoutée et le sol agité pendant une minute. L'APTES catalyse la réaction d'hydrolyse et le mélange doit être refroidi pour ralentir la vitesse de réaction.

1 mL de sol est versé dans des cuves en plastique de spectroscopie (EVERGREEN). Le sol gèle en quelques minutes lorsque sa température remonte. Les cuves sont bouchées pendant une nuit. Le lendemain, le bouchon est retiré et remplacé par un film adhésif

poreux (Dominique Dutscher AB0718) afin de commencer le séchage. Au bout d'une semaine, tout l'alcool s'est évaporé : le monolithe est sec et peut être stocké à -20°C, sous argon, dans un flacon en verre.

Pour la préparation de monolithes contenant différentes concentrations d'APTES, Les volumes décrits au Tableau 42 sont introduits.

N° synthèse	[DMPD] _{mono} (en mol.dm ⁻³)	[FeCl ₃] _{mono} (en mol.dm ⁻³)	[HCl] _{mono} (en mol.dm ⁻³)	Atmosphère	Couleur en fin de séchage
Ratio molaire TMOS/EtOH/H ₂ O : 1/4/4					
1	0,69	0	2	Argon	Rose pâle
2	0,4	0	2	Argon	Rose pâle
3	0,05	0	2	Argon	Rose pâle
4	0,58	0	2	Argon	Rose pâle
7	0,05	0	10 ^{-4,6}	Argon	jaune
8	0,05	0,005	2	Argon	Orange
9	0,05	0,025	2	Argon	jaune
10	0,05	0,11	2	Argon	Marron clair
11	0,64	0,0384	2	Argon	Marron
12	0,487	0,1461	2	Argon	Marron opaque
13	0,23	0,322	2	Argon	Noir
14	0,23	0,0161	2	Argon	Marron clair
15	0,23	0,0828	2	Argon	Marron opaque
16	0,004	0	10 ⁻²	Argon	Rose pâle
17	0,23	0,0345	2	Argon	Orange
18	0,23	0,0575	2	Argon	Orange
19	0,05	0,05	2	Argon	Orange
20	0,1	0,05	2	Argon	Orange
21	0,1	0,03	2	Argon	Orange
22	0,1	0,01	2	Argon	Orange
23	0,2	0,1	2	Argon	Marron
24	0,2	0,06	2	Argon	Orange
25	0,2	0,02	2	Argon	Orange
26	0	0	2	Argon	Incolore
27	0,05	0,025	0,1	Argon	Noir
28	0,05	0,005	0,1	Argon	Marron foncé
29	0,01	0,005	0,1	Argon	Orange pâle
30	0,01	0,001	0,1	Argon	Orange pâle
31	0,05	0	0,1	Argon	jaune
32	0	0	0,1	Argon	Incolore
33	0,01	0,005	10 ⁻²	Argon	Rose
34	0	0	10 ⁻²	Argon	Incolore
Exp1	0,009	0,006	0,1	Air	Violet opaque
Exp2	0,009	0,006	2	Air	Jaune
Exp3	0,009	0,006	6	Air	Jaune
Exp4	0,009	0	0,1	Air	Incolore
Exp5	0,009	0	2	Air	Incolore
Exp6	0,009	0	6	Air	Incolore

Tableau 41 : Tableau récapitulatif des monolithes synthétisés. Les concentrations sont données en mol.dm⁻³, une fois le monolithe sec.

	APTES_6%	APTES_8%	APTES_10%
TMOS	1,785 mL	1,785 mL	1,785 mL
MeOH	2,43 mL	2,43 mL	2,43 mL
APTES	168 µL	225 µL	280 µL
eau	864 µL	864 µL	864 µL

Tableau 42 : Volumes de réactifs à incorporer pour la préparation de sol à différentes concentrations en APTES.

De nouveaux précurseurs alcoxydes de silicium possédant des chaînes polyéthylène glycol sont incorporés dans le sol de référence à hauteur de 3 % molaire par rapport au TMOS. Ces précurseurs sont purs à 90 % et proviennent de la société ABCR (Tableau 43).

Nom du précurseur	2-[méthoxy (polyéthylèneoxy) propyl]-tri méthoxysilane 6-9 répétitions PEG	3-méthoxypropyl triméthoxysilane	2-[méthoxy (polyéthylèneoxy) propyl]- triméthoxysilane 9-12 répétitions PEG
Structure	$\text{CH}_3\text{-O-(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_{6-9}\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-Si(OMe)}_3$	$\text{CH}_3\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-Si(OMe)}_3$	$\text{CH}_3\text{-O-(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_{9-12}\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-Si(OMe)}_3$
N° CAS	[65994-07-2]	[33580-59-5]	[65994-07-2]
N° ABCR	AB111226	AB111228	AB212452
N° formule	PEG_6-9	PEG_1	PEG_9-12
Masse volumique (g/mL)	1,076	0,995	1,09
Masse molaire (g/mol)	404,7	194,3	488,86

Tableau 43 : Description et propriétés des précurseurs alcoxydes fonctionnalisés avec des chaînes PEG.

Pour la synthèse de monolithes préparés avec 3 % de précurseurs alcoxydes possédant des chaînes PEG par rapport au TMOS, les volumes incorporés sont rapportés dans le Tableau 44. Les sols sont préparés à température ambiante et gèlent au bout de 48 heures.

N° formulation	PEG_6-9	PEG_1	PEG_9-12
TMOS	1,9 mL	1,9 mL	1,9 mL
MeOH	2,586 mL	2,586 mL	2,586 mL
Précurseur PEG	144 µL	74,8 µL	171,8 µL
eau	919 µL	919 µL	919 µL

Tableau 44 : Volumes de réactifs à incorporer pour la préparation de sol contenant 3% de précurseurs fonctionnalisés PEG.

Pour la synthèse de monolithes dopés avec du DMACA et de l'acide chlorhydrique, la formule de référence contenant 3 % d'APTES est utilisée. Le DMACA et l'acide chlorhydrique étant en solution aqueuse, l'eau apportée par les solutions de DMACA et de

HCl est prise en compte dans le volume d'eau total de 1,728 mL. Les vitesses de gélification sont dépendantes de la quantité d'acide incorporée. En effet, l'APTES joue un rôle de catalyseur basique et la gélification est très rapide. En ajoutant de l'acide chlorhydrique, l'effet catalyseur de l'APTES est neutralisé et, pour 1 M d'HCl, les sols gèlent en 48 heures. En augmentant la concentration en acide chlorhydrique introduite (6 M HCl), la catalyse basique est remplacée par l'effet de catalyse acide : les sols gèlent en quelques minutes.

Annexe 10 : Détermination de la surface spécifique d'un solide poreux par adsorption d'azote (Méthode de Brunauer, Emmett et Teller dite BET)

Annexe 10.1 : Théorie

Les solides poreux, comme les matrices sol-gel, possèdent une surface spécifique élevée, c'est-à-dire que l'interface entre le solide poreux et le gaz (ou le liquide) qui l'entoure est très grande.

Cette surface spécifique (exprimée en m^2/g) peut être caractérisée expérimentalement par adsorption de gaz, le plus souvent de l'azote à sa température de liquéfaction ($T = 77K$). A l'équilibre, pour une température et une pression donnée, un certain volume V d'azote s'adsorbe à la surface du solide. L'isotherme d'adsorption représente l'ensemble des états d'équilibre correspondant à différentes pressions comprises entre 0 et la pression de vapeur saturante de l'azote) et ce, pour une température donnée. Brunauer, Emmet et Teller ont proposé un modèle qui rend compte du fait que la première couche de molécules adsorbées subit l'effet de la surface du solide contrairement aux couches supérieures. L'isotherme d'adsorption s'exprime alors suivant l'équation suivante :

$$\text{Équation 8 : } \frac{P/P_0}{V(1 - P/P_0)} = \frac{1}{V_m \cdot C} + \frac{C-1}{V_m \cdot C} \cdot \frac{P}{P_0}$$

Où

P : pression de l'azote à l'équilibre

P_0 : Pression de vapeur saturante

V : volume d'azote adsorbé par quantité de solide poreux (cm^3/g)

V_m : Volume d'azote correspondant à la première couche de molécules adsorbées (monocouche) en cm^3/g .

C : constante BET relative à l'enthalpie d'adsorption (constante spécifique du gaz employé et du matériau étudié)

Expérimentalement, l'isotherme d'adsorption représente le volume V de gaz adsorbé par gramme de solide poreux en fonction de la pression relative P/P_0 , le rapport de la pression mesurée à l'équilibre sur la pression de vapeur saturante. En traçant le terme

$\frac{P/P_0}{V\left(1 - P/P_0\right)}$ de l'Équation 8 en fonction de P/P_0 , une droite de pente $\frac{C-1}{V_m \cdot C}$ et d'ordonnée à

l'origine $\frac{1}{V_m \cdot C}$ est obtenue. Elle est appelée droite BET. V_m , le volume de la première couche d'azote, ainsi que la constante C peuvent donc être déterminées. La surface spécifique est enfin déduite de V_m selon :

Équation 9 :
$$S_{\text{spécifique}} = \frac{V_m \cdot N_A \cdot \sigma_m}{V_M}$$

Où

V_m : Volume d'azote correspondant à la monocouche de molécules adsorbées

N_A : Nombre d'Avogadro ($6,02 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$)

σ_m : surface occupée par une molécule d'azote à 77K ($0,162 \text{ nm}^2$)

V_M : volume molaire de l'azote liquide ($34,7 \text{ cm}^3/\text{mol}$)

L'isotherme d'adsorption est généralement tracée pour P/P_0 allant de 0,05 à 0,3 car c'est pour ce domaine de pressions relatives que la droite BET est obtenue et que la surface spécifique peut être déterminée. Cependant, l'isotherme d'adsorption complète permet d'obtenir davantage de résultats comme le volume total poreux et la répartition de la taille des pores. La théorie de la fonctionnelle de densité est alors utilisée.

Cinq types d'isothermes d'adsorption complète sont répertoriés (Figure 137). L'interprétation de leur allure permet d'obtenir quelques éléments sur la nature de la porosité des solides dont elles sont issues.

L'isotherme de **type I** est obtenue avec des solides ayant uniquement des micropores qui se remplissent à des pressions d'autant plus basses que leur largeur est plus faible.

L'isotherme de **type II** est obtenue avec des solides non poreux ou macroporeux à la surface desquels la couche adsorbée s'épaissit progressivement (adsorption multimoléculaire).

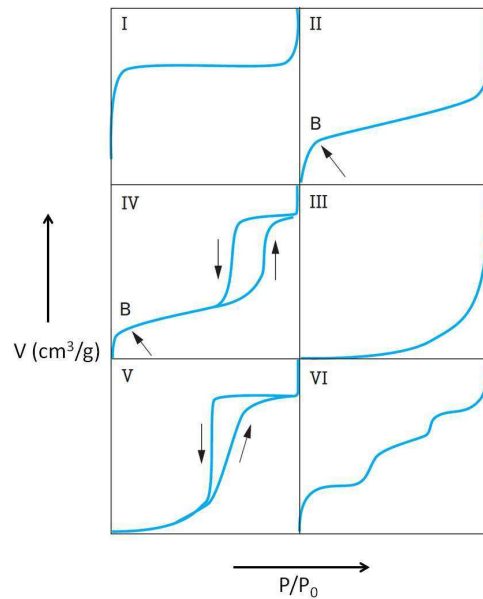


Figure 137 : Classification des isothermes d'adsorption physique

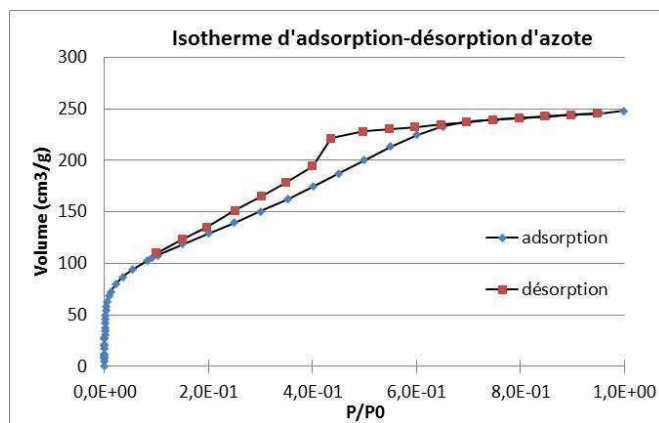
L'isotherme de **type IV** a la même allure que le type II pour les pressions relatives les plus basses. Elle est obtenue avec des adsorbants mésoporeux dans lesquels se produit une condensation capillaire. La désorption de l'azote condensé par capillarité dans les mésopores n'est pas réversible. Cette irréversibilité est due aux forces de cohésion intermoléculaires dans la phase condensée (interaction attractive) : on observe généralement une hystérèse de désorption par rapport à l'adsorption.

Les isothermes de **type III** et **V** présentent un changement de courbure du début de l'isotherme par rapport aux types II et IV. Ces isothermes sont obtenues dans le cas d'interactions faible entre le solide et le gaz, comme par exemple, lors d'adsorption de vapeur d'eau sur une surface hydrophobe.

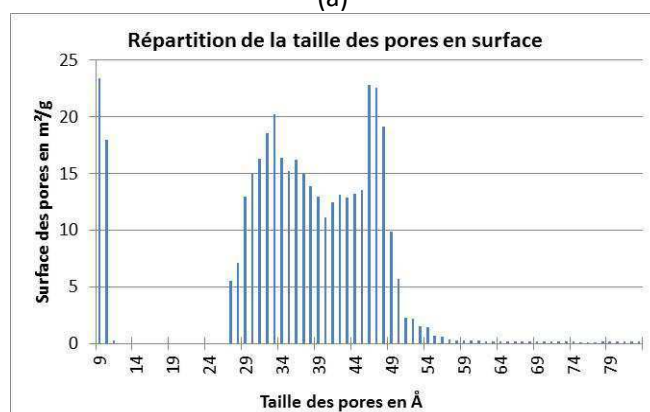
L'isotherme de **type VI** est obtenue pour des solides de surface énergétiquement homogène sur lesquelles les couches de molécules adsorbées se forment l'une après l'autre.

Annexe 10.2 : Caractérisation BET d'un monolithe sans sonde dopé à 3% d'aminopropyltriéthoxysilane (APTES)

Un capteur sans sonde dopé avec 3% d'APTES est broyé puis analysé en BET. L'isotherme d'adsorption-désorption présente une hystérèse caractéristique des solides mésoporeux (Figure 138). La taille des pores varie autour de 42 Å (Figure 138). Le monolithe a une surface spécifique de 475 m²/g.



(a)



(b)

Figure 138 : Résultats BET pour un monolithe sans sonde dopé à 3% d'APTES. (a) Courbe isotherme d'adsorption-désorption d'azote ; (b) Histogramme de la répartition des pores en surface.

Annexe 11 : Protocoles d'exposition de capteurs

Annexe 11.1 : Exposition à H₂S et MeSH

Les monolithes sont exposés à H₂S ou à MeSH. Ces gaz sont générés à partir d'une solution aqueuse de Na₂S (pour former H₂S) et de MeSNa (pour former MeSH) acidifiée au moment de l'exposition avec de l'acide chlorhydrique concentré. Une bandelette de papier imprégnée d'acétate de plomb est utilisée comme témoin. En présence d'H₂S, la bandelette noircit. L'exposition dure entre 15 heures et 17 heures.

Protocole d'exposition pour toutes les formulations

- Pour les monolithes N°1 à N°16, 5 mL de solution de Na₂S à 82,8 mM dans 50 mM NaOH sont acidifiés avec 31,3 µL d'acide chlorhydrique concentré à 37%. Le volume du dessiccateur d'exposition étant de 4,4 L, la teneur en H₂S y est de 2250 ppm.
- Les monolithes N°9 et N°17 à N°34 sont exposés individuellement dans des flacons de 50 mL. 4 mL d'une solution de Na₂S à 0,56 mM dans 25 mM NaOH sont acidifiés avec 8,5 µL d'HCl à 37%. La teneur est de 900 ppm d'H₂S.
- Un témoin est réalisé en exposant un monolithe N°9 à 4 mL de soude à 25 mM additionnée de 8,5 µL d'HCl concentré.

- Les monolithes Exp1 à Exp6 n'ont pas été exposés à H₂S mais mis en contact avec 20 µL de 50 mM Na₂S dans NaOH 50 mM (n_{H₂S} = 1 µmol).

Protocole d'exposition pour l'étude approfondie de la formulation N°9

- ✓ Les monolithes de formule N°9 étudiés à la Figure 52(a) ont été exposés à :

☒ : Dans un flacon en plastique de 50 mL, 25 µL de solution de 0,1 M de Na₂S dans 50 mM NaOH additionnés de 2,5 µL d'HCl à 37%. La teneur en H₂S est de 1 200 ppm.

☒ : Dans un vase à peser en verre de 20 mL, 9 µL de solution de 0,1 M de Na₂S dans 50 mM NaOH additionnés de 1 µL d'HCl à 37%. La teneur en H₂S est de 1080 ppm.

☒ : Dans un flacon en plastique de 50 mL, 4 mL de solution de soude à 25 mM additionnée de 8,5 µL d'HCl à 37%. Il n'y a pas d'H₂S en phase liquide ni en phase gazeuse. Ce protocole sert de témoin afin de connaître le comportement du monolithe N°9 lorsque Na₂S n'est pas introduit dans le flacon. Afin de ne changer que ce paramètre-là, une solution de soude ne contenant pas de Na₂S est acidifiée avec de l'acide chlorhydrique. L'éventuelle influence de l'humidité engendrée par la présence de soude acidifiée sera alors mise en évidence.

- ✓ Les monolithes de formule n°9 étudiés à la Figure 52(b) ont été exposés :

☒ : Dans un vase à peser en verre de 20 mL, 9 µL de solution de 0,1 M de Na₂S dans 50 mM NaOH additionnés de 1 µL d'HCl à 37%. La teneur en H₂S est de 1080 ppm.

☒ : Dans un récipient en verre de 170 mL, 76,2 µL de solution de 0,1 M de Na₂S dans 50 mM NaOH additionnés de 2 µL d'HCl à 37%. La teneur en H₂S est de 1074 ppm. Quelques grains de desséchant (CaCl₂) sont ajoutés au montage.

☒ : Dans un vase à peser en verre de 20 mL, sous atmosphère d'argon, 9 µL de solution de 0,1 M de Na₂S dans 50 mM NaOH additionnés de 1 µL d'HCl à 37%. La teneur en H₂S est de 1080 ppm.

☒ : Dans un récipient en verre de 170 mL, un monolithe est placé pendant trois jours. Aucune solution n'est ajoutée au montage.

☒ : dans un vase à peser en verre de 20 mL, sous atmosphère d'argon, 9 µL de solution de 50 mM NaOH additionnés de 1 µL d'HCl à 37%. Il n'y a pas d'H₂S en phase liquide ni en phase gazeuse.

☒ : Dans un vase à peser en verre de 20 mL, sous atmosphère d'argon, 9 µL de solution de 50 mM NaOH additionnés de 1 µL d'HCl à 37%. Il n'y a pas d'H₂S en phase liquide ni en phase gazeuse.

- ✓ Les monolithes de formule n°9 étudiés à la Figure 53 ont été exposés :

☒ : Dans un récipient en verre de 145 mL, 1,353 mL de solution de 0,48 M de MeSNa dans 50 mM NaOH additionnés de 720 µL d'HCl à 37%. La teneur en MeSH est de 96 300 ppm.

☒ : Dans un flacon en plastique de 50 mL, 5,2 µL de solution de 0,48 M de MeSNa dans 50 mM NaOH additionnés de 1,2 µL d'HCl à 37%. La teneur en MeSH est de 1200 ppm.

- ✓ Les monolithes de formule n°9 étudiés à la Figure 54(a) ont été exposés :

☒ : Dans un récipient en verre de 170 mL, 76,16 μL de solution de 0,1 M de Na_2S dans 50 mM NaOH additionnés de 1,6 μL d'HCl à 37% ainsi que 15,87 μL de solution de 0,48 M de MeSNa dans 50 mM NaOH additionnés de 1 μL d'HCl à 37%. Les teneurs en H_2S et MeSH sont toutes les deux de 1073 ppm. Quelques grains de desséchant (CaCl_2) sont ajoutés au montage.

☒ : Dans un récipient en verre de 170 mL, 76,16 μL de solution de 0,1 M de Na_2S dans 50 mM NaOH additionnés de 1,6 μL d'HCl à 37% ainsi que 15,87 μL de solution de 0,48 M de MeSNa dans 50 mM NaOH additionnés de 1 μL d'HCl à 37%. Les teneurs en H_2S et MeSH sont toutes les deux de 1073 ppm.

✓ Les monolithes de formule n°9 étudiés à la Figure 54(b) ont été exposés:

☒ : Dans un récipient en verre de 145mL, 3,248 mL de solution de 0,1 M de Na_2S dans 50 mM NaOH additionnés de 67 μL d'HCl à 37% ainsi que 677 μL de solution de 0,48 M de MeSNa dans 50 mM NaOH additionnés de 30 μL d'HCl à 37%. Les teneurs en H_2S et MeSH sont respectivement de 50 915 ppm et 51 700 ppm. Le spectre obtenu est comparé aux spectres de monolithes exposés à 1 074 ppm d' H_2S et 96 300 ppm de MeSH.

Annexe 11.2 : Exposition de monolithes au p-nitrophénol à partir d'une solution éthanolique

Les monolithes sont exposés dans un montage schématisé sur la Figure 139. Dans un récipient en verre de volume $V_r = 100$ mL sont placés le monolithe et un morceau d'aluminium de volume $V_{\text{alu}} = 1,41$ mL initialement à 60°C. Une solution de pNP à 44 mM dans l'éthanol est préparée. 10 μL de cette solution sont déposés sur le morceau d'aluminium à 60°C. Le montage est ensuite placé à 37°C pendant 24 heures.

Au contact de l'aluminium, la solution éthanolique de pNP s'évapore. L'atmosphère du récipient contient donc $n_{\text{pNP}} = C \times V = 44 \cdot 10^{-3} \times 10 \cdot 10^{-6} = 4,4 \cdot 10^{-7}$ mol soit $1,06 \cdot 10^{-5}$ L de pNP gazeux (le volume molaire vaut $V_m = 24$ L.mol⁻¹ à 20°C).

Le volume de la phase gazeuse du récipient vaut $V_{\text{gaz}} = V_r - V_{\text{alu}} = 100 - 1,41 = 98,6$ mL. La teneur en pNP dans la phase gazeuse du récipient est donc de :

Teneur en pNP = $V_{\text{pNP}}/V_{\text{gaz}} = 1,06 \cdot 10^{-5}/9,86 \cdot 10^{-2} = 107$ ppm.

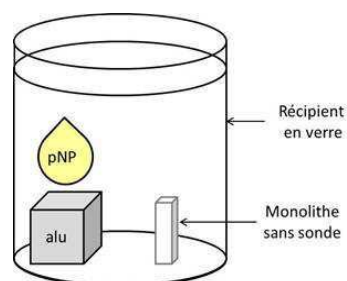


Figure 139 : Schéma du montage d'exposition de monolithes à une solution éthanolique de pNP

Annexe 11.3 : Exposition de monolithes au p-nitrophénol à partir d'une solution aqueuse

Exposition d'un monolithe sans sonde

Un monolithe est placé dans un petit récipient de volume $V_r = 2,5$ mL schématisé sur la Figure 140. Un monolithe occupe un volume $V_{\text{mono}} = 0,08$ mL. 200 μL d'une solution à 0,11 M de pNP dans l'eau est placé dans le récipient, en présence du monolithe. Le récipient est mis à l'étuve à 37°C. Un équilibre entre le pNP en phase gazeuse et le pNP en phase aqueuse s'instaure selon la loi de Henry. Le volume de la phase gazeuse vaut $V_{\text{gaz}} = V_r - V_{\text{mono}} - V_{\text{goutte}} = 2,5 - 0,08 - 0,2 = 2,22$ mL. La constante de Henry du pNP vaut $H_{\text{cc}} = 4,13 \cdot 10^{-5}$.

$$x = \frac{H_{\text{cc}} \frac{V_G}{V_L}}{1 + H_{\text{cc}} \frac{V_G}{V_L}} = \frac{4,13 \cdot 10^{-5} \frac{2,22}{0,2}}{1 + 4,13 \cdot 10^{-5} \frac{2,22}{0,2}} = 0,000458$$

et $teneur = \frac{x \cdot n_{\text{pNP, tot}} \cdot V_m}{V_G} = \frac{0,000458 \cdot 2,2 \cdot 10^{-5} \cdot 24}{0,00222} = 109 \text{ ppm}$

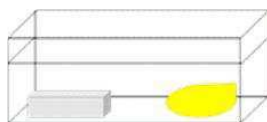


Figure 140 : Schéma du montage utilisé pour l'exposition de monolithes à une solution aqueuse de pNP (109 ppm).

Annexe 11.4 : Exposition de monolithes à la β -naphthylamine à partir d'une solution éthanolique

Les monolithes et les films minces sont exposés dans un montage schématisé sur la Figure 139. La démarche utilisée est la même que celle décrite en Annexe 11.2.

Exposition du monolithe

Récipient en verre $V_r = 30$ mL ; morceau d'aluminium $V_{\text{al}} = 3$ mL ; $[\beta\text{-NA}]_{\text{EtOH}} = 10,9$ mM ; $V_{\beta\text{-NA}} = 11$ μL ; Volume molaire $V_m = 24$ L.mol⁻¹ ; Teneur en $\beta\text{-NA} = 107$ ppm.

Exposition de films minces

Récipient en verre $V_r = 100$ mL ; morceau d'aluminium $V_{\text{al}} = 1,41$ mL ; $[\beta\text{-NA}]_{\text{EtOH}} = 50$ mM ; $V_{\beta\text{-NA}} = 9$ μL ; Volume molaire $V_m = 24$ L.mol⁻¹ ; Teneur en $\beta\text{-NA} = 110$ ppm.

Annexe 12 : Réponse colorimétrique des monolithes exposés à H₂S

Seules les photos avant et après exposition à H₂S des monolithes représentatifs des cas 1 à 4 sont regroupées dans le Tableau 45. Les spectres d'absorption correspondant se trouvent à la Figure 141.

N° synthèse	[DMPD] _{mono} (en mol.dm ⁻³)	[FeCl ₃] _{mono} (en mol.dm ⁻³)	[HCl] _{mono} (en mol.dm ⁻³)	Avant exposition	Après exposition
Ratio molaire TMOS/EtOH/H ₂ O : 1/4/4					







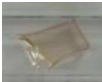

9	0,05	0,025	2		 2250 ppm H ₂ S
19	0,05	0,05	2		
24	0,2	0,06	2		
33	0,01	0,005	10-2		

Tableau 45 : Photos des monolithes synthétisés puis exposés à H₂S.

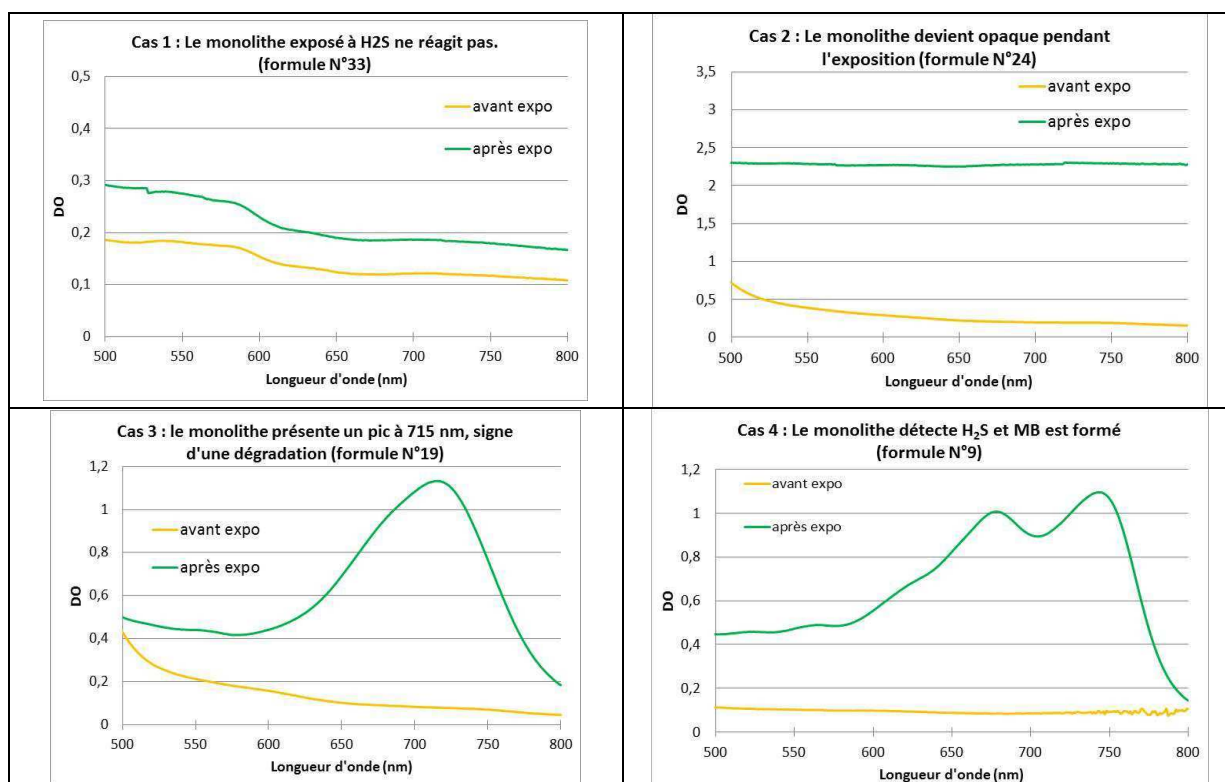


Figure 141 : Spectres d'absorption des monolithes après exposition à H₂S.

Annexe 13 : Synthèse de la molécule sonde Naphthol AS-BI déméthylé

La synthèse de la molécule sonde est réalisée suivant le protocole décrit dans l'article de Lu. [15] La réaction a lieu sous atmosphère d'argon, dans une verrerie sèche. A

[15] G. Lu, J. E. Grossman and J. B. Lambert, **General but Discriminating Fluorescent Chemosensor for Aliphatic Amines**, *Journal of Organic Chemistry*, **2006**, *71*, 1769-1776.

température ambiante, 1 g (2,7 mmol) de Naphthol AS-BI est dissous dans 38 mL de dichlorométhane anhydre. A l'aide d'une ampoule d'introduction, 22,4 mL (10,6 mmol) de tribromoborane à 1 M dans le dichlorométhane anhydre sont ajoutés au goutte à goutte. La réaction étant exothermique, le ballon est maintenu à 0°C dans un bain d'eau glacée. La solution est initialement jaune limpide. Un précipité jaune apparaît lors de l'ajout des 5 premiers millilitres de tribromoborane, puis le milieu réactionnel redevient limpide et orange. En fin d'ajout, une suspension orange est obtenue. Le milieu réactionnel reste agité toute une nuit à température ambiante.

Le lendemain, une chromatographie sur couche mince (CCM) est réalisée sur le milieu réactionnel dans un mélange acétate d'éthyle/cyclohexane : 3/7 pour suivre la réaction. Comme les molécules contiennent de nombreux cycles aromatiques, une révélation aux ultraviolets et au permanganate de potassium est possible (Figure 142). Le produit a bien été formé. Le Naphthol AS-BI et le produit déméthylé ont un rapport frontal de 0,56 et 0,41 respectivement, ce qui est logique puisque le Naphthol AS-BI est moins polaire donc moins retenu sur le support de silice.

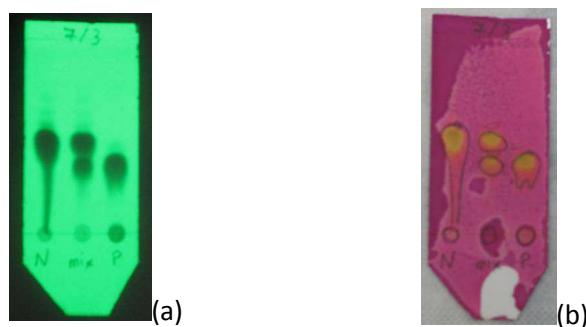


Figure 142 : (a) Révélation UV de la CCM du produit déméthylé (P) et du Naphthol AS-BI (N) grâce à un mélange acétate d'éthyle/cyclohexane 3/7. (b) Révélation de la même plaque CCM au permanganate de potassium.

L'hydrolyse du milieu réactionnel est réalisée en introduisant lentement 50 mL de méthanol. Un fort dégagement gazeux se produit et le milieu réactionnel devient jaune limpide. L'agitation est poursuivie pendant 2 heures à température ambiante.

Le milieu réactionnel est ensuite lavé au méthanol. Tout le solvant est évaporé et un résidu jaune orange est obtenu. Il est lavé 10 fois avec 10 mL de méthanol. Le contenu du ballon est marron verdâtre.

D'après Lu, il est possible de recrystalliser le produit obtenu en dissolvant tout le solide avec du méthanol chaud et en ajoutant ensuite du diéthyl éther. Nous avons tenté cette recrystallisation, mais sans succès. Une purification par chromatographie sur colonne est donc réalisée avec un mélange acétate d'éthyle/cyclohexane : 3/7. Une pureté de 99,0 % est obtenue. Elle est déterminée à partir du spectre RMN ^1H . Le rendement total de la réaction et de la purification est de 30 % (mol/mol).

La caractérisation RMN ^1H du Naphthol AS-BI déméthylé et du réactif de départ est réalisée dans le DMSO deutéré avec un spectromètre Bruker 300 MHz. Il reste des traces de solvants et de l'eau dans l'échantillon qui contient bien le produit souhaité. La disparition du

pic à $\delta=3,92\text{ppm}$ correspondant au méthyl et l'apparition du pic de la fonction alcool à $\delta=10,14\text{ppm}$ en sont la preuve (Figure 143).

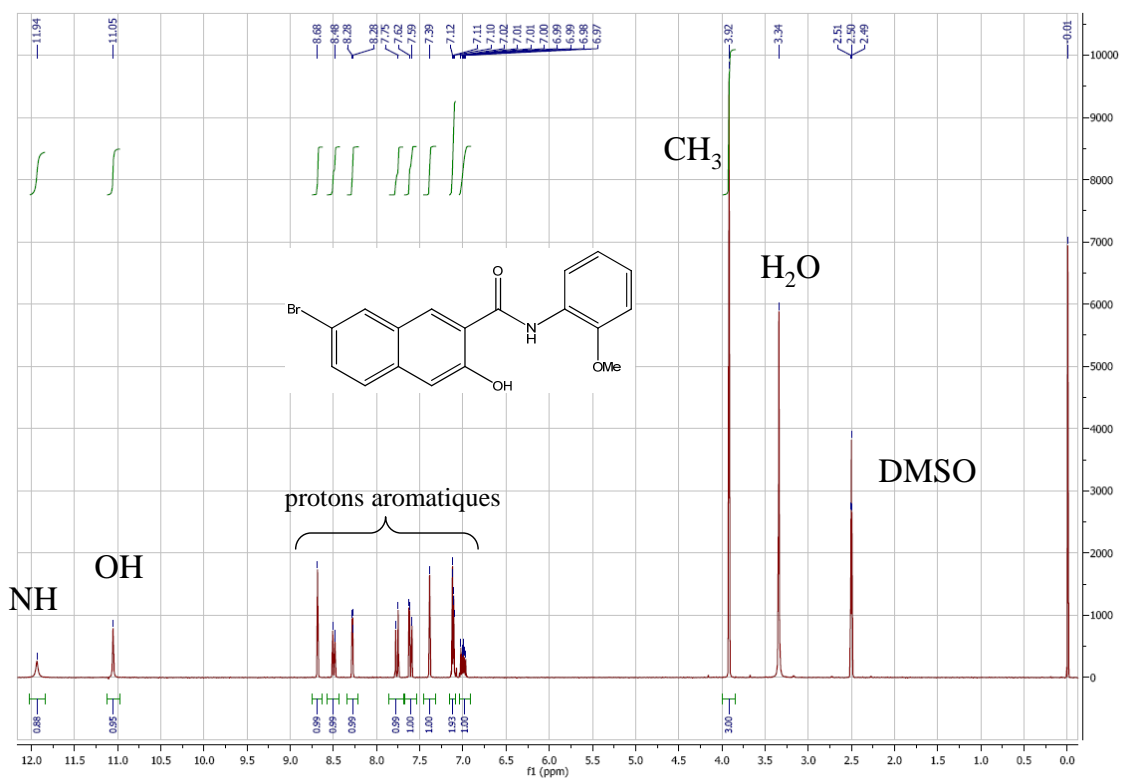
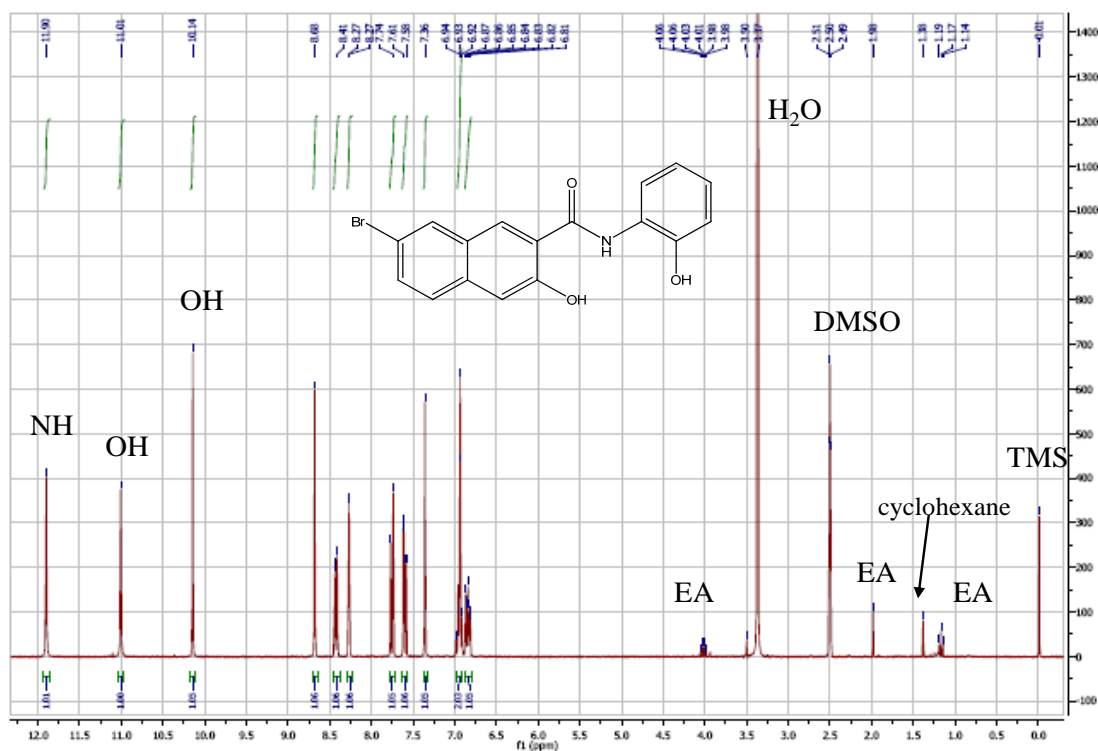


Figure 143. (a) RMN ^1H dans le DMSO deutéré du produit Naphthol AS-BI déméthylé. (b) RMN ^1H dans le DMSO deutéré du produit de départ Naphthol AS-BI.

Annexe 14 : Description de la méthode de Job utilisée pour la détermination de la stœchiométrie du complexe Naphthol AS-BI déméthylé/cadavérine dans l'acétonitrile.

La méthode de Job, appelée également "*méthodes des variations continues*", est une technique spectroscopique d'étude des équilibres de complexation en solution, permettant de déterminer graphiquement la stœchiométrie et la stabilité des espèces formées en solution. Elle repose sur le principe que l'absorbance totale d'une solution est la somme de l'absorbance de chacun des réactifs sans interaction et de l'absorbance des complexes issus de l'interaction entre ces réactifs. Pour différentes compositions de la solution, l'écart entre l'absorbance totale de la solution et la somme des absorbances de chacun des réactifs est dû à la formation du complexe.

Cette méthode s'applique dans les conditions suivantes :

- le système obéit à la loi de Beer-Lambert
- un seul complexe est formé
- la composition de la solution varie de telle sorte que, si les espèces ne se complexaient pas, la somme de leur concentration serait constante
- le pH et la force ionique de la solution sont maintenus constants

Voici les calculs relatifs à l'emploi de cette méthode lors du mélange en solution de deux espèces A et B formant un complexe AB.

Soient

- (E) l'activité de l'espèce E et [E], la concentration de l'espèce E
- ϵ_E coefficient d'extinction molaire de l'espèce E à une longueur d'onde λ
- C_E^0 concentration de la solution de E utilisée pour préparer le mélange
- V_E le volume de la solution de E utilisée pour préparer le mélange
- $n_E^0 = C_E^0 \cdot V_E$ quantité de matière de l'espèce E utilisée pour préparer le mélange
- V le volume du mélange : $V = V_A + V_B$
- x la fraction molaire de B qu'il y aurait dans la solution à l'équilibre si aucune réaction de complexation n'avait lieu : $x = n_B^0 / (n_A^0 + n_B^0)$
- C la concentration totale : $C = (n_A^0 + n_B^0) / V$
- $d = \sum_E \epsilon_E \cdot [E] \cdot l$ est la densité optique du mélange dans une cellule de chemin optique l
- d(x) la densité optique du mélange pour la composition de fraction molaire x à une longueur d'onde donnée.

$$F(x) = d(x) / (C \cdot l) - (1-x) \cdot \epsilon_A - x \cdot \epsilon_B \quad (S0)$$

quantifie l'écart d'additivité des absorbances de A et B lors du mélange, en fonction de x. Le graphe de Job est tracé selon $d(x) / (C \cdot l) - (1-x) \cdot \epsilon_A - x \cdot \epsilon_B$ en fonction de x.

Lors du mélange en solution de A et de B, le complexe AB est formé suivant la réaction d'équilibre $A + B \rightleftharpoons AB$ caractérisée suivant la loi d'action de masse par la constante d'équilibre suivante :

$$K_d = \frac{(A)(B)}{(AB)}$$

A faible concentration les activités sont assimilables aux concentrations. En écrivant les équations de conservation de la matière, le système (S) suivant est obtenu:

$$(S1) \quad [AB] = K_d \cdot [A] \cdot [B]$$

$$(S2) \quad [A] + [AB] = C \cdot (1 - x)$$

$$(S3) \quad [B] + [AB] = C \cdot x$$

Si la constante K_d est assez faible, il est possible de négliger les concentrations de B pour $x \in [0 ; \frac{1}{2}[$ et de A pour $x \in]\frac{1}{2} ; 1]$. Ces approximations amènent les résultats suivants :

$$0 \leq x < \frac{1}{2} \quad [B] \approx 0 \text{ à l'équilibre} \quad \Leftrightarrow \quad [AB] \approx Cx \quad [A] \approx C \cdot (1-2x)$$

$$\text{donc :} \quad d(x) \approx d_1(x) = C.l.\{x.(\epsilon_{AB} - 2 \epsilon_A) + \epsilon_A\}$$

$$F(x) \approx F_1(x) = x.(\epsilon_{AB} - \epsilon_A - \epsilon_B)$$

$$\frac{1}{2} < x \leq 1 \quad [A] \approx 0 \text{ à l'équilibre} \quad \Leftrightarrow \quad [AB] \approx C \cdot (1-x) \quad [B] \approx C \cdot (2x - 1)$$

$$\text{donc :} \quad d(x) \approx d_2(x) = C.l.\{x.(2 \epsilon_B - \epsilon_{AB}) + \epsilon_{AB} - \epsilon_B\}$$

$$F(x) \approx F_2(x) = (1-x).(\epsilon_{AB} - \epsilon_A - \epsilon_B)$$

Loin du point d'équivalence, le graphe de Job $y = F(x)$ est confondu avec l'une des deux droites d'équations $y = F_1(x)$ ou $y = F_2(x)$. **Les pentes de ces deux droites (p et $-p$) permettent de déterminer le coefficient d'extinction molaire du complexe : $p = \epsilon_{AB} - \epsilon_A - \epsilon_B$ (avec ϵ_A et ϵ_B déterminés préalablement). Ces deux droites sont sécantes en un point I, d'abscisse x_I qui donne la stœchiométrie du complexe, et d'ordonnée $y_I = \frac{1}{2} (\epsilon_{AB} - \epsilon_A - \epsilon_B)$.**

Dans le cadre de la thèse, le graphe de Job est tracé pour des solutions dans l'acétonitrile. Les droites $F_1(x)$ et $F_2(x)$ sont sécantes en un point d'abscisse $x = 0,5$. La stœchiométrie du complexe est donc de ArOH/cadavérine : 1/1.

Annexe 15 : Génération de mCOV exogènes en milieu biologique, composition des milieux osmogènes

Annexe 15.1 : Génération de *p*-nitrophénol

Milieu osmogène tamponné avec de l'acide 3-(N-morpholino)propanesulfonique (MOPS)

Ce milieu est tamponné à un pH de 7,33 et sa composition est détaillée au Tableau 46.

Substrat 4-nitrophenyl- β -D-glucuronide	114 μ M
Sulfate de magnésium ($MgSO_4$)	2,5 mM
Chlorure de sodium (NaCl)	131 mM
Glucuronate de sodium	815 μ M
Méthyl- β -D-glucuronide	830 μ M
3-(N-morpholino)propanesulfonique (MOPS)	143 mM

Tableau 46 : Composition du milieu osmogène pNPG tamponné avec du MOPS

L'ajout de glucuronate de sodium et de méthyl- β -D-glucuronide permet d'induire l'activité β -glucuronidase [16] chez les bactéries pour qu'elles dégradent le substrat pNPG plus rapidement.

Milieu osmogène tamponné avec de l'acide 2-morpholino-éthanesulfonique (MES)

Ce milieu est tamponné à un pH de 6,1 et sa composition est détaillée au Tableau 47.

Substrat 4-nitrophenyl- β -D-glucuronide	113 μ M
Sulfate de magnésium (MgSO ₄)	2,08 mM
Chlorure de sodium (NaCl)	86 mM
Glucuronate de sodium	461 μ M
Méthyl- β -D-glucuronide	240 μ M
Bio-soyase	2 g/L
Extraits de levure	2 g/L
MES sel de sodium	75 mM
MES acide monohydrate	75 mM

Tableau 47 : Composition du milieu osmogène pNPG tamponné avec du MES

Tout comme le milieu MOPS, le milieu MES contient des inducteurs d'activité l'activité β -glucuronidase. De plus, il est enrichi avec de la bio-soyase et des extraits de levure pour favoriser la multiplication des bactéries.

Annexe 15.2 : Génération de β -naphthylamine

Le milieu osmogène L-alanine- β -naphthylamide (L-ala- β NA) est préparé à partir d'un milieu gélosé bioMérieux TSA (Tryptic Soy Agar, Ref. 41 467) et d'une solution éthanolique de L-ala- β NA dont les compositions sont décrites dans les Tableau 48 et Tableau 49.

Peptone de caséine (bovin)	15 g
Peptone de soja	5 g
Chlorure de sodium	g
Agar	15 g
Eau purifiée	1 L

Tableau 48 : Composition d'un litre de milieu gélosé TSA à pH 7,3.

Substrat L-Ala β -NA (Sigma A2628)	53,7 mg
Ethanol (Fluka 02850)	5 mL

Tableau 49 : Composition de la solution à 50 mM de L-Ala β -NA.

Pour 100 mL de milieu osmogène, 100 mL de TSA sont fondus au bain marie à 90°C. Lorsqu'il est refroidi mais encore liquide (50°C), 500 μ L de solution éthanolique de substrat L-Ala- β -NA à 50 mM (filtrée à 0,2 μ m \varnothing) sont introduits. Le milieu gélosé contient ainsi 250 μ M de L-Ala- β -NA. Après homogénéisation, le milieu est immédiatement coulé dans des boîtes de Petri.

[16] P.R. Marcoux, M. Dupoy, R. Mathey, A. Novelli-Rousseau, V. Heran, S. Morales, F. Rivera, P.L. Joly, J.P. Moy, F. Mallard, Micro-confinement of bacteria into w/o emulsion droplets for rapid detection and enumeration, Colloids Surf., A 377 (2011) 54-62.

Références bibliographiques

- [1] **Surveillance des toxi-infections alimentaires collectives**, *source invs*, données de la déclaration obligatoire 2009, mars 2011.
- [2] Jean-Yves Leveau, Marielle Bouix, Jean-Paul Larpent, **Sécurité microbiologique des procédés alimentaires**, *Techniques de l'ingénieur*, F 1 120
- [3] D. Dupont, **Applications des biocapteurs dans l'industrie agroalimentaire**, *Techniques de l'Ingénieur*, f4010.
- [4] N. Gilmartin and R. O'Kennedy, **Nanobiotechnologies for the detection and reduction of pathogens**, *Enzyme and Microbial Technology*, **2012**, *50*, 87-95.
- [5] *Journal of AOAC International*, **2006**
- [6] V. Velusamy, K. Arshak, O. Korostynska, K. Oliwa and C. Adley, **An overview of foodborne pathogen detection: In the perspective of biosensors**, *Biotechnology Advances*, **2010**, *28*, 232-254.
- [7] Christine Vernozy-Rozand, **Méthodes de détection rapide en microbiologie alimentaire**, *Techniques de l'ingénieur*, F1 130
- [8] M. Naimuddin and K. Nishigaki, **Genome analysis technologies: Towards species identification by genotype**, *Briefings in functional genomics and proteomics*, **2003**, *1*, 356-371.
- [9] M. Manafi, **Fluorogenic and chromogenic enzyme substrates in culture media and identification tests**, *International Journal of Food Microbiology*, **1996**, *31*, 45-58.
- [10] <http://www.mybiolumix.com/>
- [11] J. C. Jokerst, J. A. Adkins, B. Bisha, M. M. Mentele, L. D. Goodridge and C. S. Henry, **Development of a Paper-Based Analytical Device for Colorimetric Detection of Select Foodborne Pathogens**, *Analytical Chemistry*, **2012**, *84*, 2900-2907.
- [12] Pierre-Yves Montfajon, **Contrôle bactériologique in situ dans les unités de cuisine collective**, *Techniques de l'ingénieur*, F1 140
- [13] <http://www.zerobacter.com/BACTER-TEST-desinfection-milieu-hospitalier-desinfectant-hygiene-proprete-norme-legislation-homologation.acsimodulo,AP,6>
- [14] T. Geng, M. T. Morgan and A. K. Bhunia, **Detection of Low Levels of Listeria monocytogenes Cells by Using a Fiber-Optic Immunosensor**, *Applied and Environmental Microbiology*, **2004**, *70*, 6138-6146.
- [15] <http://vicam.com/>
- [16] Y.-T. Liu, **A technological update of molecular diagnostics for infectious diseases**, *Infect Disorads Drug Targets*, **2008**, *8*, 183-188.
- [17] Laperriere, G.; Duhaime, C. and Cardinal, P. *Direction des laboratoires d'expertises et d'analyses alimentaires, Agriculture Pêcheries et Alimentation Québec*, **2004**,

-
- [18] <http://www.cephidinternational.com/systems-and-software/genexpert-infinity-80-system>
- [19] <http://www.valeurdimage.com/IMG/pdf/CommuniqueClinique.pdf>
- [20] <http://www.advancedbioimaging.com/>
- [21] K. Maquelin, C. Kirschner, L.-P. Choo-Smith, N. A. Ngo-Thi, T. van Vreeswijk, M. Stammler, H. P. Endtz, H. A. Bruining, D. Naumann and G. J. Puppels, **Prospective Study of the Performance of Vibrational Spectroscopies for Rapid Identification of Bacterial and Fungal Pathogens Recovered from Blood Cultures**, *Journal of Clinical Microbiology*, **2003**, *41*, 324-329.; A. Sengupta, M. Mujacic and E. Davis, **Detection of bacteria by surface-enhanced Raman spectroscopy**, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2006**, *386*, 1379-1386 ; W. R. Premasiri, D. T. Moir, M. S. Klempner, N. Krieger, G. Jones and L. D. Ziegler, **Characterization of the Surface Enhanced Raman Scattering (SERS) of Bacteria**, *The Journal of Physical Chemistry* , **2004**, *109*, 312-320.
- [22] A. Alvarez-Ordóñez, D. J. M. Mouwen, M. López and M. Prieto, **Fourier transform infrared spectroscopy as a tool to characterize molecular composition and stress response in foodborne pathogenic bacteria**, *Journal of Microbiological Methods*, **2011**, *84*, 368-378.
- [23] M. P. Colin, **Afssa fiche de description de danger microbiologique transmissible par les aliments : Salmonella spp.**, septembre **2009**.
- [24] www.oxoid.com
- [25] <http://www.generalchemical.ca/H2S-removal-and-odor-control.html>
- [26] T. K. J. Edison, C. M. Yoshida, A. B. Reis, I. S. Melo and T. T. Franco, **Fast detection of hydrogen sulfide using a biodegradable colorimetric indicator system**, *Polymer International*, **2011**, *60*, 951-956.
- [27] <http://www.etsu.edu/com/genomics/omics/somedefinitions.aspx> East Tennessee state university website : integrating genomics into medical education.
- [28] R. Chen, G. I. Mias, J. Li-Pook-Than, L. Jiang, H. Y. K. Lam, R. Chen, E. Miriami, K. J. Karczewski, M. Hariharan, F. E. Dewey, Y. Cheng, M. J. Clark, H. Im, L. Habegger, S. Balasubramanian, M. O'Huallachain, J. T. Dudley, S. Hillenmeyer, R. Haraksingh, D. Sharon, G. Euskirchen, P. Lacroute, K. Bettinger, A. P. Boyle, M. Kasowski, F. Grubert, S. Seki, M. Garcia, M. Whirl-Carrillo, M. Gallardo, M. A. Blasco, P. L. Greenberg, P. Snyder, T. E. Klein, R. B. Altman, A. J. Butte, E. A. Ashley, M. Gerstein, K. C. Nadeau, H. Tang and M. Snyder, **Personal Omics Profiling Reveals Dynamic Molecular and Medical Phenotypes**, *Cell*, **2012**, *148*, 1293-1307.
- [29] R. Goodacre, **Metabolomics – the way forward**, *Metabolomics*, **2005**, *1*, 1-2.
- [30] D.-C. Wang, C.-H. Sun, L.-Y. Liu, X.-H. Sun, X.-W. Jin, W.-L. Song, X.-Q. Liu and X.-L. Wan, **Serum fatty acid profiles using GC-MS and multivariate statistical analysis: potential biomarkers of Alzheimer's disease**, *Neurobiology of aging*, **2012**, *33*, 1057-1066.
- [31] O. M. A. El-Agnaf, S. A. Salem, K. E. Paleologou, M. D. Curran, M. J. Gibson, J. A. Court, M. G. Schlossmacher and D. Allsop, **Detection of oligomeric forms of synuclein protein in**

human plasma as a potential biomarker for Parkinson's disease, *The FASEB Journal*, **2006**, *20*, 419-425.

[32] P. R. Srinivas, M. Verma, Y. Zhao and S. Srivastava, **Proteomics for Cancer Biomarker Discovery**, *Clinical Chemistry*, **2002**, *48*, 1160-1169.

[33] N. A. Rakow, A. Sen, M. C. Janzen, J. B. Ponder and K. S. Suslick, **Molecular Recognition and Discrimination of Amines with a Colorimetric Array**, *Angewandte Chemie*, **2005**, *44*, 4538-4532.

[34] S. Schulz and J. S. Dickschat, **Bacterial volatiles : the smell of small organisms**, *Natural Products Reports*, **2007**, *24*, 814-842.

[35] M. Dunkel, U. Schmidt, S. Struck, L. Berger, B. Gruening, J. Hossbach, I. S. Jaeger, U. Effmert, B. Piechulla, R. Eriksson, J. Knudsen and R. Preissner, **SuperScent—a database of flavors and scents**, *Nucleic Acids Research*, **2009**, *37*, D291-D294.

[36] Y. Xu, W. Cheung, C. L. Winder and R. Goodacre, **VOC-based metabolic profiling for food spoilage detection with the application to detecting Salmonella typhimurium-contaminated pork**, *Anal. Bioanal. Chem*, **2010**, *397*, 2439-2449.

[37] M. Z. El-Fouly, A. A.-F. M. Shahin and H. A.-A. El-Bialy, **Biological control of sapstain fungi in Egyptian wood stores and infected trees**, *Ann. Microbiol.*, **2011**, *61*, 789-799.

[38] S. Jayaraman, R. Walia and N. Alagirisamy, **Fluorescein mercuric acetate—A novel sensor for oral malodour detection**, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **2010**, *148*, 54-58.

[39] A. Miller III, R.A. Scanlan, J.S. Lee, L.M. Libbey, M.E. Morgan, **Volatile compounds produced in sterile fish muscle (Sebastes melanops) by Pseudomonas perolens**, *Appl. Microbiol.*, **1973**, *25*, 257–261.

[40] **Rapid detection of volatile organic compounds for identification of bacteria in a sample**, The Charles Stark Draper Laboratory Inc., WO2009/091375 A9, Septembre 2009.

[41] M. Lechner, M. Fille, J. Hausdorfer, M. P. Dierich and J. Rieder, **Diagnosis of bacteria in vitro by mass spectrometry fingerprinting : a pilot study**, *Current Microbiology*, **2005**, *51*, 267-269.

[42] C. E. Garner, S. Smith, B. d. L. Costello, P. White, R. Spencer, C. S. J. Probert and N. M. Ratcliffe†, **Volatile organic compounds from feces and their potential for diagnosis of gastrointestinal disease**, *The FASEB Journal*, **2007**, *21*, 1675-1688.

[43] M. Jünger, W. Vautz, M. Kuhns, L. Hofmann, S. Ulbricht, J. I. Baumbach, M. Quintel and T. Perl, **Ion mobility spectrometry for microbial volatile organic compounds: a new identification tool for human pathogenic bacteria**, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **2012**, *93*, 2603-2614.

[44] Y.-P. Ho and P. M. Reddy, **Advances in Mass Spectrometry for the Identification of Pathogens**, *Mass Spectrometry Reviews*, **2011**, *30*, 1203-1224.

[45] A. Zlatkis, W. Bertsch, H. A. Lichtenstein, A. Tishbee and F. Shunbo, **Profile of Volatile Metabolites in Urine by Gas Chromatography-Mass Spectrometry**, *Analytical Chemistry*, **1973**, *45*, 763-767.

-
- [46] M. Lechner, M. Fille, J. Hausdorfer, M. P. Dierich and J. Rieder, **Diagnosis of bacteria in vitro by mass spectrometry fingerprinting : a pilot study**, *Current Microbiology*, **2005**, *51*, 267-269.
- [47] R. A. Allardyce, A. L. Hill and D. R. Murdoch, **The rapid evaluation of bacterial growth and antibiotic susceptibility in blood cultures by selected ion flow tube mass spectrometry**, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, **2006**, *55*, 255-261.
- [48] A. Wieser, L. Schneider, J. Jung and S. Schubert, **MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics : identification of microorganisms and beyond**, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **2012**, *93*, 965-974.
- [49] E. Carbonnelle, C. Mesquita, E. Bille, N. Day, B. Dauphin, J.-L. Beretti, A. Ferroni, L. Gutmann and X. Nassif, **MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory**, *Clinical Biochemistry*, **2011**, *44*, 104-109.
- [50] <http://pappso.inra.fr/MALDITOF/application.html> ; <http://www.spectropole.u-3mrs.fr/masse5.html> ; <http://www.mass-spec.espci.fr/Appareils.html>
- [51] J.W. Gardner, P.N. Bartlett, **Electronic Noses: Principles and Applications**, *Oxford University Press*, UK, **1999**.
- [52] Edith PAJOT-AUGY, Jasmina VIDIC, **Nez électroniques de dernière génération : les nanobiosenseurs**, *Techniques de l'ingénieur*, **2007**, re87.
- [53] C. Pijolat, **Capteurs de gaz à base d'oxydes métalliques**, p87, *Ecole d'été "capteurs chimiques, biocapteurs et biopuces"*, La Rochelle, **Octobre 2011**.
- [54] S. Hossein Hosseini, S. Hossein Abdi Oskooei, A. Akbar Entezami, **Toxic gas and vapour detection by polyaniline gas sensors**, *Iranian Polymer Journal*, **2005**, *14*, 4, 333-344.
- [55] J. P. H. Lima and A. M. D. Andrade, **Electrical and Optical Response of a Conducting Polymer Gas Sensor**, *Electrochemical Science and Technology Transactions*, **2008**, *14*, 21-26.
- [56] G. E. Collins and L. J. Buckley, **Conductive polymer-coated fabrics for chemical sensing**, *Synthetic Metals*, **1996**, *78*, 93-101.
- [57] D. Fu, H. Lim, Y. Shi, X. Dong, S. G. Mhaisalkar, Y. Chen, S. Moochhala and L.-J. Li, **Differentiation of Gas Molecules Using Flexible and All-Carbon Nanotube Devices**, *The Journal of Physical Chemistry Letters*, **2008**, *112*, 650-653.
- [58] S. H. Lee, H. J. Jin, H. S. Song, S. Hong and T. H. Park, **Bioelectronic nose with high sensitivity and selectivity using chemically functionalized carbon nanotube combined with human olfactory receptor**, *Journal of Biotechnology*, **2012**, *157*, 467-472.
- [59] M. Castro, B. Kumar, J. F. Feller, Z. Haddi, A. Amari and B. Bouchikhi, **Novel e-nose for the discrimination of volatile organic biomarkers with an array of carbon nanotubes (CNT) conductive polymer nanocomposites (CPC) sensors**, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **2011**, *159*, 213-219.
- [60] J. F. Feller, J. Lu, K. Zhang, B. Kumar, M. Castro, N. Gatta and H. J. Choi, **Novel architecture of carbon nanotube decorated poly(methyl methacrylate) microbead vapour sensors assembled by spray layer by layer**, *Journal of Materials Chemistry*, **2011**, *21*, 4142.

-
- [61] A. Star, V. Joshi, S. Skarupo, D. Thomas and J.-C. P. Gabriel, **Gas Sensor Array Based on Metal-Decorated Carbon Nanotubes**, *Journal of Physical Chemistry B*, **2006**, *110*, 21014-21020.
- [62] Y.-M. Yang, P.-Y. Yang and X.-R. Wang, **Electronic nose based on SAWS array and its odor identification capability**, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **2000**, *66*, 167-170.
- [63] X. Chen, M. Cao, Y. Li, W. Hu, P. Wang, K. Ying and H. Pan, **A study of an electronic nose for detection of lung cancer based on a virtual SAWgas sensors array and imaging recognition method**, *Measurement Science and Technology*, **2005**, *16*, 1535-1546.
- [64] Q. Ameer and S. B. Adeloju, **Polypyrrole-based electronic noses for environmental and industrial analysis**, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **2005**, *106*, 541-552.
- [65] www.alphamos.com
- [66] M. Bruins, A. Bos, P. L. C. Petit, K. Eadie, A. Rog, R. Bos, G. H. v. Ramshorst and A. v. Belkum, **Device-independent, real-time identification of bacterial pathogens with a metal oxide-based olfactory sensor**, *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, **2009**, *28*, 775-780.
- [67] T. D. Gibson, O. Prosser, J. N. Hulbert, R. W. Marshall, P. Corcoran, P. Lowery, E. A. Ruck-Keene and S. Heron, **Detection and simultaneous identification of microorganisms from headspace samples using an electronic nose.**, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **1997**, *44*, 413-422.
- [68] A. K. Pavlou, N. Magan, C. McNulty, J. M. Jones, D. Sharp, J. Brown and A. P. F. Turner, **Use of an electronic nose system for diagnoses of urinary tract infections**, *Biosensors & Bioelectronics*, **2002**, *17*, 893-899.
- [69] J. Weile and C. Knabbe, **Current applications and future trends of molecular diagnostics in clinical bacteriology**, *Anal. Bioanal. Chem*, **2009**, *394*, 731-742.
- [70] K. Dutta and S. Mukhopadhyay, **Chemical oxidation of methylene blue using a Fenton-like reaction**, *Journal of Hazardous Materials*, **2001**, *B84*, 57-71.
- [71] N. A. Rakow and K. S. Suslick, **A colorimetric sensor array for odour visualization**, *Nature*, **2000**, *406*, 710-713.
- [72] C. L. Exstrom, J. John R. Sowa, C. A. Daws, D. Janzen and K. R. Mann, **Inclusion of Organic Vapors by Crystalline, Solvatochromic [Pt(aryl isonitrile)₄] [Pd(CN)₄] Compounds. "Vapochromic" Environmental Sensors**, *Chemistry of Materials*, **1995**, *7*, 15-17.
- [73] A. Sen, J. D. Albarella, J. R. Carey, P. Kim and W. B. McNamara, **Low-cost colorimetric sensor for the quantitative detection of gaseous hydrogen sulfide**, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **2008**, *134*, 234-237.
- [74] L. Feng, C. J. Musto, J. W. Kemling, S. H. Lim and K. S. Suslick, **A colorimetric sensor array for identification of toxic gases below permissible exposure limits**, *Chemical Communications*, **2010**, *46*, 2037-2039.
- [75] M. Xu, B. R. Bunes and L. Zang, **Paper-Based Vapor Detection of Hydrogen Peroxide: Colorimetric Sensing with Tunable Interface**, *Applied Materials and Interfaces*, **2011**, *3*, 642-647.

-
- [76] N. A. Rakow, M. S. Wendland, J. E. Trend, R. J. Poirier, D. M. Paolucci, S. P. Maki, C. S. Lyons and M. J. Swierczek, **Visual Indicator for Trace Organic Volatiles**, *Langmuir Letter*, **2010**, *26*, 3767-3770.
- [77] X.-M. Hu, Q. Chen, D. Zhou, J. Cao, Y.-J. He and B.-H. Han, **One-step preparation of fluorescent inorganic-organic hybrid material used for explosive sensing**, *Polymer Chemistry*, **2011**, *2*, 1124-1128.
- [78] P. Adhyapak, P. Mahapure, R. Aiyer, S. Gosavi, U. Mulik and D. Amalnerkar, **Effect of m-Nitroaniline Doping on the Optical Humidity-Sensing Characteristics of Cobalt/Poly(vinyl alcohol) Nanocomposites**, *Journal of Applied Polymer Science*, **2012**, *123*, 3565-3574.
- [79] C. Munkholm and D. R. Walt, **A fiber-optic sensor for CO₂ measurement**, *Talanta*, **1988**, *35*, 109-112.
- [80] <http://www.oceanoptics.com/products/sensorcoatings.asp>
- [81] A. E. Eroglu, M. Volkan and O. Y. Ataman, **Fiber optic sensors using novel substrates for hydrogen sulfide determination by solid surface fluorescence**, *Talanta*, **2000**, *53*, 89-101.
- [82] M. D. Marazuela and M. C. Moreno-Bondi, **Fiber-optic biosensors – an overview**, *Anal. Bioanal. Chem*, **2002**, *372*, 664-482.
- [83] K. I. Oberg, R. Hodyss and J. L. Beauchamp, **Simple optical sensor for amine vapors based on dyed silica microspheres**, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **2006**, *115*, 79-85.
- [84] A. Pistore, M. Guglielmi, G. Brusatin, H. K. Kang, C. Ferraris and F. Romanato, **Active solgel thin film on nanostructured plasmonic surface**, *Solid States Sciences*, **2010**, *12*, 1898-1902.
- [85] A. B. Descalzo, M. D. Marcos, C. Monte, R. Martinez-Manez and K. Rurack, **Mesoporous silica materials with covalently anchored phenoxazinone dyes as fluorescent hybrid materials for vapour sensing**, *Journal of Materials Chemistry*, **2007**, *17*, 4716-4723.
- [86] M. Comes, M. D. Marcos, R. Martinez-Mañez, F. Sancenon, J. Soto, L. A. Villaescusa, P. Amoros and D. Beltran, **Chromogenic discrimination of primary aliphatic amines in water with functionalized mesoporous silica**, *Advanced Materials*, **2004**, *16*, 1783-1786.
- [87] Hélène Paolacci, **Capteurs chimiques   transduction optique de polluants atmosph eriques   base de matériaux nanoporeux. Application au formaldéhyde et autres composés carbonyl es**, thèse soutenue le 4 décembre 2006
- [88] A. Korpi, A. L. Pasanen, P. Pasanen and P. Kalliokoski, **Microbial growth and metabolism in house dust**, *International Biodeterioration and Biodegradation*, **1997**, *40*, 19-27.
- [89] M. A. Eberhardt and J. M. Sieburth, **A colorimetric procedure for the determination of aldehydes in seawater and in cultures of methylotrophic bacteria**, *Marine Chemistry*, **1985**, *17*, 199-212.
- [90] J. Nuccio, P. J. Seaton and R. J. Kieber, **Biological production of formaldehyde in the marine environment**, *Limnology and Oceanography*, **1995**, *40*, 521-527.
- [91] S. Mariano, W. Wang, G. Brunelle, Y. Bigay and T.-H. Tran-Thi, **Colorimetric detection of formaldehyde: A sensor for air quality measurements and a pollution-warning kit for**

homes, *Procedia Engineering Eurosensor XXIV Conference Eurosensor XXIV Conference*, **2010**, 5, 1184-1187.

[92] Crunaire, S.; Marcoux, P. R.; Guillemot, L.-H.; Ngoa, K.-Q.; Mallard, F.; Moy, J.-P. and Tran-Thi, T.-H., **Discriminating Bacteria With Functionalised Nanoporous Xerogels**, *Procedia Chemistry*, **2012**, *accepted in April 2012*.

[93] Moller V., **Distribution of amino acid decarboxylases in *Enterobacteriaceae***, *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica*, **1954**, 35, 259-277

[94] Ewing W.H., Davis B.R. and Edwards P.R., **The decarboxylase reaction of *Enterobacteriaceae* and their value in taxonomy**, *Pub. Hlth. Labs.*, **1960**, 18, 77-83.

[95] M. H. S. Santos, **Biogenic amines: their importance in foods**, *International Journal of Food Microbiology*, **1996**, 29, 213-231.

[96] A. R. Shalaby, **Significance of biogenic amines to food safety and human health**, *Food Research International*, **1996**, 29, 675-690.

[97] G. Leyral and E. Vierling, **Microbiologie et toxicology des aliments –Hygiène et sécurité alimentaires 4e édition**, *Biosciences et Techniques*, Edition dirigée par J. Figarella et F. Zonszain, ISSN 1159-11-02, p85.

[98] S. Orenge, A. L. James, M. Manafi, J. D. Perry and D. H. Pincus, **Enzymatic substrates in microbiology**, *Journal of Microbiological Methods*, **2009**, 79, 139-155.

[99] C. Petit, B. Levasseur, B. Mendoza and T. J. Bandosz, **Reactive adsorption of acidic gases on MOF/graphite oxide composites**, *Microporous and Mesoporous Materials Special Issue: Characterisation of Porous Solids IX*, **2012**, 154, 107-112.

[100]I. V. Manukhov, D. V. Mamaeva, S. M. Rastorguev, N. G. Faleev, E. A. Morozova, T. V. Demidkina and G. B. Zavilgelsky, **A gene encoding L-methionine gamma-lyase is present in *Enterobacteriaceae* family genomes: Identification and characterization of *Citrobacter freundii* L-methionine gamma-lyase**, *Journal of Bacteriology*, **2005**, 187, 3889-3893.

[101]A. Drotar, G. A. Burton, J. E. Tavernier and R. Fall, **Widespread Occurrence of Bacterial Thiol Methyltransferases and the Biogenic Emission of Methylated Sulfur Gases**, *Applied and Environmental Microbiology*, **1987**, 53, 1626-1631.

[102] K. Shatalin, E. Shatalina, A. Mironov and E. Nudler, **H₂S: A Universal Defense Against Antibiotics in Bacteria**, *Science*, **2011**, 334, 986-990.

[103]M. Fu, W. Zhang, L. Wu, G. Yang, H. Li and R. Wang, **Hydrogen sulfide (H₂S) metabolism in mitochondria and its regulatory role in energy production**, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **2012**, 109, 2943-2948.

[104] N. S. Lawrence, J. Davis and R. G. Compton, **Analytical strategies for the detection of sulfide: a review**, *Talanta*, **2000**, 52, 771-784.

[105] N. Bonnard, T. Clavel, M. Falcy, A. Hesbert, D. Jargot, M. Reynier et O. Schneider, **Fiche Toxicologique FT32 Sulfure d'Hydrogène**, *Institut National de Recherche et de Sécurité pour la prévention des accidents du travail et des maladies professionnelles*, Edition 2009.

-
- [106]H. Xu, J. e. Wu, C.-H. Chen, L. Zhang and K.-L. Yang, **Detecting hydrogen sulfide by using transparent polymer with embedded CdSe/CdS quantum dots**, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **2010**, *143*, 535-538.
- [107] **Le sulfure (sous forme de H₂S)**, *Santé Canada*, Novembre 1987 révisé en Septembre 1992.
- [108]F. Yu, P. Li, P. Song, B. Wang, J. Zhao and K. Han, **An ICT-based strategy to a colorimetric and ratiometric fluorescence probe for hydrogen sulfide in living cells**, *Chemical Communications*, **2012**, *48*, 2852-2854.
- [109]T. Kumeria, L. Parkinson and D. Losic, **A nanoporous interferometric micro-sensor for biomedical detection of volatile sulphur compounds**, *Nanoscale Research Letters*, **2011**, *6*, 634.
- [110]L. Ciaffoni, R. Peverall and G. A. D. Ritchie, **Laser spectroscopy on volatile sulfur compounds: possibilities for breath analysis**, *Journal of Breath Research*, **2011**, *5*, 024002.
- [111] X. Tiancun, A. Lidun, Z. Weimin, S. Shishan and X. Guoxin, **Mechanism of sulfur poisoning on supported noble metal catalyst : the adsorption and transformation of sulfur on palladium catalysts with different supports**, *Catalysis Letters*, **1992**, *12*, 287-296.
- [112] S. K. Pandey, K.-H. Kim and K.-T. Tang, **A review of sensor-based methods for monitoring hydrogen sulfide**, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **2012**, *32*, 87-99.
- [113] www.chromatotec.com
- [114]P. Jeroschewski, K. Haase, A. Trommer and P. Gräßler, **Galvanic sensor for the determination of hydrogen sulphide/sulphide in aqueous media**, *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, **1993**, *346*, 930-933.
- [115]P. Jeroschewski and S. Braun, **A flow analysis system with an amperometric detector for the determination of hydrogen sulphide in waters**, *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, **1996**, *354*, 169-172.
- [116]M. Garcia-Calzada, G. Marban and A. B. Fuertes, **Potentiometric determination of sulphur in solid samples with a sulphide selective electrode**, *Analytica Chimica Acta*, **1999**, *380*, 39-45.
- [117]Marie-Pierre Vivarat-Perrin, **Quatorze détecteurs d'hydrogène sulfuré passés au banc d'essai**, *Mesure 815*, **2009**, 30-33
- [118] www.cairpol.com
- [119] <http://www.alphasense.com/>
- [120] <http://www.lazarlab.com/home.html> ; <http://shelfscientific.com/cgi-bin/tame/newlaz/h2ssystem-m20.tam?ofr=58901101>
- [121] www.directindustry.fr
- [122]P. Jeroschewski, C. Steuckart and M. Kuhl, **An Amperometric Microsensor for the Determination of H₂S in Aquatic Environments**, *Analytical Chemistry*, **1996**, *68*, 4351-4357.

-
- [123]G. Schiavon, G. Zotti, R. Toniolo and G. Bontempelli, **Electrochemical Detection of Trace Hydrogen Sulfide in Gaseous Samples by Porous Silver Electrodes Supported on Ion-Exchange Membranes (Solid Polymer Electrolytes)**, *Analytical Chemistry*, **1995**, *67*, 318-323.
- [124]Y. Cao, X. Hu, D. Wang, Y. Sun, P. Sun, J. Zheng, J. Ma and G. Lu, **Flower-like hierarchical zinc oxide architectures: Synthesis and gas sensing properties**, *Materials Letters*, **2012**, *69*, 45-47.
- [125]N. Izadi, A. M. Rashidi, S. Golzardi, Z. Talaei, A. R. Mahjoub and M. H. Aghili, **Hydrogen sulfide sensing properties of multi walled carbon nanotubes**, *Ceramics International*, **2012**, *38*, 65-75.
- [126] D. W. H. Fam, A. I. Y. Tok, A. Palaniappan, P. Nopphawan, A. Lohani and S. G. Mhaisalkar, **Selective sensing of hydrogen sulphide using silver nanoparticle decorated carbon nanotubes**, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **2009**, *138*, 189-192.
- [127]D. F. S. Natusch, J. R. Sewell and R. L. Tanner, **Determination of Hydrogen sulfide in air-an assesment of impregnated paper tape methods**, *Analytical Chemistry*, **1974**, *46*, 410-415.
- [128] M. Ugliano and P. A. Henschke, **Comparison of three methods for accurate quantification of hydrogen sulfide during fermentation**, *Analytica Chimica Acta*, **2010**, *660*, 87-91.
- [129]S. Vasireddy, K. W. S. Jr and H. B. M. Jr, **Cadmium(II)-exchanged zeolites as a solid sorbent for the preconcentration and determination of hydrogen sulfide in air**, *Analytical Chemistry*, **1981**, *53*, 868-873.
- [130]S. J. Hawkins, N. M. Ratcliffe and A. Sagastizabal, **The use of thin silver films for the detection of low concentrations of hydrogen sulphide**, *Analytica Chimica Acta*, **1998**, *359*, 125-132.
- [131] <http://www.morphotec.com/>
- [132] G.M. Mikaylov, K.S. Kirolos, K.L. Lockerby, **Direct-read colorimetric exposimeter**, *International patent*, **1994**, WO 5364593.
- [133]I. Maeda, H. Yamashiro, D. Yoshioka, M. Onodera, S. Ueda, M. Kawase, H. Miyasaka and K. Yagi, **Colorimetric dimethyl sulfide sensor using Rhodovulum sulfidophilum cells based on intrinsic pigment conversion by CrtA**, *Biotechnological Products And Process Engineering*, **2006**, *70*, 397-402.
- [134]M. M. F. Choi and P. Hawkins, **Development of an optical hydrogen sulphide sensor**, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **2003**, *90*, 211-215.
- [135]J. Rodriguez-Fernández, J. M. Costa, R. Pereiro and A. Sanz-Medel, **Simple detector for oral malodour based on spectrofluorimetric measurements of hydrogen sulphide in mouth air**, *Analytica Chimica Acta*, **1999**, *398*, 23-31.
- [136]M. M. F. Choi, **Fluorimetric optode membrane for sulfide detection**, *The Analyst*, **1998**, *123*, 1631-1634.
- [137]M. R. Shahriari and J. Ding, **Active silica-gel films for hydrogen sulfide optical sensor application**, *Optics Letters*, **1994**, *19*, 1085-1087.

-
- [138]J. Rodriguez-Fernandez, R. Pereiro and A. Sanz-Medel, **Optical fibre sensor for hydrogen sulphide monitoring in mouth air**, *Analytica Chimica Acta*, **2002**, *471*, 13-23.
- [139]M. F. Mousavi and M. Shamsipur, **Spectrophotometric determination of trace amounts of sulfide ion based on its catalytic reduction of toluidine blue**, *Bulletin of the chemical society of japan*, **1992**, *65*, 2770-2772.
- [140]A. Safavi, A. Rahmani and V. N. Hosseini, **Kinetic-spectrophotometric determination of sulfide by its reaction with resazurin**, *Journal of analytical chemistry*, **1996**, *354*, 502-504.
- [141]D. Gergel and A. I. Cederbaum, **Interaction of Nitric Oxide with 2-Thio-5-nitrobenzoic Acid : Implications for the Determination of Free Sulfhydryl Groups by Ellman's Reagent**, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **1997**, *347*, 282-288.
- [142]R. E. Humphrey, M. H. Ward and W. Hinze, **Spectrophotometric determination of sulfite with 4,4'-dithiodipyridine and 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)**, *Analytical Chemistry*, **1970**, *42*, 698-702.
- [143]S. M. Z. Hossain, R. E. Luckham, A. M. Smith, J. M. Lebert, L. M. Davies, R. H. Pelton, C. D. M. Filipe and J. D. Brennan, **Development of a Bioactive Paper Sensor for Detection of Neurotoxins Using Piezoelectric Inkjet Printing of Sol-Gel-Derived Bioinks**, *Analytical Chemistry*, **2009**, *81*, 5474-5483.
- [144]C. K. Riener, G. Kada and H. J. Gruber, **Quick measurement of protein sulfhydryls with Ellman's reagent and with 4,4'-dithiodipyridine**, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2002**, *373*, 266-276.
- [145]S. R. Bhat, J. M. Eckert and N. A. Gibson, **A reduction—spectrophotometric method for the determination of sulphate in waters**, *Analytica Chimica Acta*, **1981**, *128*, 263-267.
- [146]K. J. Wallace, S. R. Cordero, C. P. Tan, V. M. Lynch and E. V. Anslyn, **A colorimetric response to hydrogen sulfide**, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **2007**, *120*, 362-367.
- [147]J. Rodriguez-Fernandez, R. Lopez-Fernandez, R. Pereiro, M. Menendez, J. M. Tejerina, A. Sicilia and A. Sanz-Medel, **A sorbent tube for oral malodour monitoring**, *Talanta*, **2004**, *62*, 421-426.
- [148]J. M. Davidson, Z. Pikramenou, A. Ponce and R. E. P. Winpenny, **Measurement of Parts per Million Level Gaseous Concentration of Hydrogen Sulfide by Ultraviolet Spectroscopy using 1,1,1,5,5,5-Hexafluoropentan-2,4-dione as a Derivative by Reaction of Cu(hfac)(1,5-Cyclooctadiene)**, *Analytical Chemistry*, **2009**, *81*, 3669_3675.
- [149] A. Pichard, M. Bisson, N. Houeix, G. Gay, G. Lacroix, J. P. Lefevre, H. Magaud, V. Migne, A. Morin et S. Tissot, **Cuivre et ses dérivés**, *Fiches de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques*, *INERIS –DREC-02-25590-02DF54*, version n° 1-5 Mars **2005**.
- [150]T. D. Rees, Gyllensp.Ab and A. C. Docherty, **Determination of Trace Amounts of Sulphide in Condensed Steam with Nn-Diethyl Para Phenylenediamine**, *Analyst*, **1971**, *96*, 201-&.

-
- [151] V. Singh, S. Gosain, S. Mishra, A. Jain and K. K. Verma, **Solid-phase extraction and spectrophotometric determination of hydrogen sulfide in air and water utilizing ethylene blue formation**, *The Analyst*, **2000**, *125*, 1185-1188.
- [152] R. M. Statham Thorn, D. M. Reynolds and J. Greenman, **Multivariate analysis of bacterial volatile compounds profiles for discrimination between selected species and strains in vitro**, *Journal of Microbiological Methods*, **2011**, *84*, 258-264.
- [153] A. Coiffier, T. Coradin, C. Roux, O. M. M. Bouvet and J. Livage, **Sol-gel encapsulation of bacteria: a comparison between alkoxide and aqueous routes**, *Journal of Materials Chemistry*, **2001**, *11*, 2039-2044.
- [154] N. Nassif, C. Roux, T. Coradin, M.-N. Rager, O. M. M. Bouvet and J. Livage, **A sol-gel matrix to preserve the viability of encapsulated bacteria**, *Journal of Materials Chemistry*, **2003**, *13*, 203-208.
- [155] M. Amoura, N. Nassif, C. Roux, J. Livage and T. Coradin, **Sol-gel encapsulation of cells is not limited to silica: long-term viability of bacteria in alumina matrices**, *Chemical Communications*, **2007**, 4015-4017.
- [156] M. Perullini, M. Amoura, C. Roux, T. Coradin, J. Livage, M. L. Japas, M. Jobbagy and S. A. Bilmes, **Improving silica matrices for encapsulation of Escherichia coli using osmoprotectors**, *Journal of Materials Chemistry*, **2011**, *21*, 4546-4552.
- [157] Optical absorption of Methylene Blue by Scott Prah, Oregon Medical Laser Center ; <http://omlc.ogi.edu/spectra/mb/index.html>
- [158] A. M. Mika, K. Lorentz and A. Szczurek, **PHOTOREDUCTION OF METHYLENE BLUE IN NAFION MEMBRANE**, *Journal of Membrane Science*, **1989**, *41*, 163-176.
- [159] V. Kuban, P. K. Dasgupta and J. N. Marx, **Nitroprusside and Methylene Blue Methods for Silicone Membrane Differentiated Flow Injection Determination of Sulfide in Water and Wastewater**, *Analytical Chemistry*, **1992**, *64*, 36-43.
- [160] M. A. Spaziani, J. L. Davis, M. Tinani and M. K. Carroll, **On-line Determination of Sulfide by the 'Methylene Blue Method' With Diode-laser-based Fluorescence Detection**, *The Analyst*, **1997**, *122*, 1555-1557.
- [161] L. Ferrer, J. M. Estela and V. Cerda, **A smart multisyringe flow injection system for analysis of sample batches with high variability in sulfide concentration**, *Analytica Chimica Acta*, **2006**, *573-574*, 391-398.
- [162] P. K. Dasgupta and H.-C. Yang, **Trace determination of aqueous sulfite, sulfide and methanethiol by fluorometric flow injection analysis**, *Analytical Chemistry*, **1986**, *58*, 2839-2844.
- [163] L. K. J. Tong, **Kinetics of deamination of oxidized N,N-disubstituted p-phenylenediamines**, *Journal of Physical Chemistry*, **1954**, *58*, 1090-1097.
- [164] J. F. Corbett, **An historical review of the use of dye precursors in the formulation of commercial oxidation hair dyes**, *Dyes and Pigments*, **1999**, *41*, 127-136.

-
- [165] S. Trivic, V. Leskovac, J. Zeremski, M. Vrvic and G. W. Winston, **Bioorganic Mechanisms of the Formation of Free Radicals Catalyzed by Glucose Oxidase**, *Bioorganic Chemistry*, **2002**, *30*, 95-106.
- [166] P. Person, J. H. Felton and D. J. O'Connell, **The fate of Wurster's red free radical in tissues with high and low oxygen utilizations (heart muscle and gingiva)**, *The Journal of Histochemistry and cytochemistry*, **1969**, *17*, 807-813.
- [167] M. I. Gil, F. A. Tomas-Barberan, B. Hess-Pierce, D. M. Holcroft and A. A. Kader, **Antioxidant Activity of Pomegranate Juice and Its Relationship with Phenolic Composition and Processing**, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, *48*, 4581-4589.
- [168] J. M. Rodriguez-Nogales, J. Vila-Crespo and M. Gomez, **Development of a rapid method for the determination of the antioxidant capacity in cereal and legume milling products using the radical cation DMPD⁺**, *Food Chemistry*, **2011**, *129*, 1800-1805.
- [169] M. Richoux and A. Harriman, **Attempted photoproduction of hydrogen using sulphophthalocyanines as chromophores for three-components systems**, *Journal of The Chemical Society, Faraday Transactions II*, **1980**, *76*, 1618-1626.
- [170] O. Varga, M. Kubinyi, T. Vidoczy, P. Baranyai, I. Bitter and M. Kallay, **Methylene blue-calixarenesulfonate supramolecular complexes and aggregates in aqueous solutions**, *Journal of Photochemistry and Photobiology A:*, **2009**, *207*, 167-172.
- [171] J. Olmsted, **Calorimetric Determinations of Absolute Fluorescence Quantum Yields**, *The Journal of Physical Chemistry*, **1979**, *83*, 2581-2584.
- [172] S. Pande, S. K. Ghosh and S. Nath, **Reduction of methylene blue by thiocyanate: Kinetic and thermodynamic aspects**, *Journal of Colloid and Interface Science*, **2006**, *299*, 421-427.
- [173] S.-A. Ong, E. Toorisaka, M. Hirata and T. Hano, **Biodegradation of redox dye Methylene Blue by up-flow anaerobic sludge blanket reactor**, *Journal of Hazardous Materials*, **2005**, *B124*, 88-94.
- [174] K. Dutta and S. Mukhopadhyay, **Chemical oxidation of methylene blue using a Fenton-like reaction**, *Journal of Hazardous Materials*, **2001**, *B84*, 57-71.
- [175] P. C. White, N. S. Lawrence, J. Davis and R. G. Compton, **Electrochemically initiated 1,4 additions: a versatile route to the determination of thiols**, *Analytica Chimica Acta*, **2001**, *447*, 1-10.
- [176] E. Fischer, *Chemische Berichte*, **1883**, *16*, 2234.
- [177] N. S. Lawrence, J. Davis, L. Jiang, T. G. J. Jones, S. N. Davis and R. G. Compton, **Selective determination of thiols : a novel electroanalytical approach**, *The Analyst*, **2000**, *125*, 661-663.
- [178] P. K. Dasgupta and L. Wei, **Determination sulfide mercaptans caustic scrubbing liquor**, *Analytica Chimica Acta*, **1989**, *226*, 165-170.
- [179] C. Wurster, R. Sendtner, *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, **1879**, *12*, 1803
- [180] N. S. Lawrence, J. Davis, L. Jiang, T. G. J. Jones, S. N. Davies and R. G. Compton, **The electrochemical Analog of the Methylene Blue Reaction : A novel amperometric approach to the detection of hydrogen sulfide.**, *Electroanalysis*, **2000**, *12*, 1453-1460.

-
- [181]A. D. Modestov, J. Gun, I. Savotine and O. Lev, **On-line electrochemical–mass spectrometry study of the mechanism of oxidation of N,N-dimethyl-p-phenylenediamine in aqueous electrolytes**, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **2004**, 565, 7-19.
- [182]H. E. Moore, M. J. Garmendia and W. J. Cooper, **Kinetics of monochloramine oxidation of N,N-diethyl-p-phenylenediamine**, *Environ. Sci. Technol.*, **1984**, 18, 348-353.
- [183] Moller et Memming, *Z. elektrochim*, **1973**, 10-11, 879.
- [184]Alain Henriet, **Oxydation de la N,N-diméthyl-para-phénylènediamine en milieu aqueux : étude électrochimique en couche mince transparente**, Thèse de doctorat, Université Paris VI, 1974.
- [185] P. S. Rao and E. Hayon, **Oxidation of Aromatic Amines and Diamines by OH Radicals. Formation and Ionization Constants of Amine Cation Radicals in Water**, *The Journal of Physical Chemistry*, **1975**, 79, 1063-1066.
- [186]L. Michaelis, **A potentiometric study of Wurster's red and blue**, *Journal of The American Chemical Society*, **1931**, 53, 2953-2962.
- [187]L. Michaelis and A. Granick, **The Polymerization of the Free Radicals of the Wurster Dye Type: the Dimeric Resonance Bond**, *Journal of American Chemical Society*, **1943**, 65, 1747-1755.
- [188]L. K. J. Tong and C. Glesmann, **The Mecanism of Dye Formation in Color Photography 3. Oxidative condensation with para-phenylenediamines in aqueous alkaline solutions**, *Journal of American Chemical Society*, **1957**, 79, 583-592.
- [189]T. Erabi, F. Arifuku and M. Tanaka, **Anodic oxidation of N,N dimethyl p phenylenediamine with sodium sulfate**, *Bulletin of the chemical society of japan*, **1973**, 46, 3582-3583.
- [190]L. Michaelis, M. P. Schubert and A. Granick, **The free radicals of the type of Wurster's salts**, *Journal of American Chemical Society*, **1939**, 61, 1981-1992.
- [191]L. Michaelis, **Semiquinones, the intermediate steps of reversible organic oxidation-reduction**, *Chemical Reviews*, **1935**, 16, 243-285.
- [192] **Willstätter R. and Mayer E., Ber. 37, 1505(1904)**
- [193]L. K. J. Tong, C. Glesmann and R. L. Bent, **The mechanism of dye formation in color photography.7. Intermediate bases in the deamination of quinonediimines**, *Journal of American Chemical Society*, **1960**, 82, 1988-1996.
- [194]U. Nickel and B. Thormann, **Determination of hexacyanoferrate based on its catalytic influence on the oxidation of p-phenylenediamine by iron (III)**, *Fresenius zeitschrift fur analytische chemie*, **1990**, 336, 316-319.
- [195]L.-E. Paulsson and G. Petterson, **Stability of oxidation products of dimethyl-p-phenylene diamine**, *Acta Chemica Scandinavica*, **1969**, 23, 2727-2732.
- [196]A. G. Brito-Madurro, L. F. Ferreira, S. N. Vieira, R. G. Ariza, L. R. G. Filho and J. M. Madurro, **Immobilization of purine bases on a poly-4-aminophenol matrix**, *Journal of Material Science*, **2007**, 42, 3238-3243.

-
- [197] J. Schwarz, W. Oelbner, H. Kaden, F. Schumer and H. Hennig, **Voltammetric and spectroelectrochemical studies on 4-aminophenol at gold electrodes in aqueous and organic media**, *Electrochimica Acta*, **2003**, *48*, 2479-2486.
- [198] H. J. Salavagione, J. Arias-Pardilla, J. L. Vasquez, M. C. Miras, E. Morallon and C. Barbero, **Spectroelectrochemical study of the oxidation of diaminophenols on platinum electrodes in acidic medium**, *Electrochimica Acta*, **2005**, *50*, 5414-5422.
- [199] <http://ressources.univ-lemans.fr/AccesLibre/UM/Pedago/chimie/01/deug/CHIM204B/pdf/fer7.pdf>
- [200] B. M. Latta and R. W. Taft, **Substituent Effects on the Hyperfine Splitting Constants of N,N-Dimethylaniline Cation Radicals**, *Journal of The American Chemical Society*, **1967**, *27*, 5172-5178.
- [201] J. Griffiths and R. Cox, **Light absorption and stability properties of some near-IR indamine dyes related to Bindschedler's green**, *Dyes and Pigments*, **1999**, *42*, 29-34.
- [202] N. G. Lewis and J. Bigelsen, **Methylene blue and other indicators in general acids. The acidity function**, *Journal of The American Chemical Society*, **1943**, *65*, 1144-1150.
- [203] K. Takagi, Y. Tatsumi, K. Kitaichi, M. Iwase, E. Shibata, M. Nakao, T. Matsumoto, K. Takagi and T. Hasegawa, **A sensitive colorimetric assay for polyamines in erythrocytes using oat seedling polyamine oxidase**, *Clinica Chimica Acta*, **2004**, *340*, 219-227.
- [204] G. Schwarzenbach and L. Michaelis, **Semi radicals in the indamine and indophenol groups**, *Journal of The American Chemical Society*, **1938**, *60*, 1667-1678.
- [205] **Fiche Toxicologique FT190 Méthanethiol**, *Institut National de Recherche et de Sécurité pour la prévention des accidents du travail et des maladies professionnelles*, Edition 2007.
- [206] R. Sander, **Compilation of Henry's Law Constants for Inorganic and Organic Species of Potential Importance in Environmental Chemistry (Version 3)**, **1999**, <http://www.henrys-law.org>
- [207] E. Galardon, A. Tomas, P. Roussel and I. Artauda, **New fluorescent zinc complexes: towards specific sensors for hydrogen sulfide in solution**, *Dalton Transactions*, **2009**, 9126-9130.
- [208] Z. Pawlak, A.S. Pawlak, **Modification of iodometric determination of total and reactive sulfide in environmental samples**, *Talanta*, **1999**, *48*, 347.-353
- [209] D. L. Cason and H. M. Neumann, **Stability of Chloro-Complexes of Iodine in Aqueous Solution**, *Journal of the American Chemical Society*, **1961**, *83*, 1822-&.
- [210] D. A. Palmer, R. W. Ramette and R. E. Mesmer, **Triiodide Ion Formation Equilibrium and Activity-Coefficients in Aqueous-Solution**, *Journal of Solution Chemistry*, **1984**, *13*, 673-683.
- [211] A. R. Shalaby, **Significance of biogenic amines to food safety and human health**, *Food Research International*, **1996**, *29*, 675-690.
- [212] E. Larque, M. Sabater-Molina and S. Zamora, **Biological significance of dietary polyamines**, *Nutrition*, **2007**, *23*, 87-95.

-
- [213] M. H. S. Santos, **Biogenic amines: their importance in foods**, *International Journal of Food Microbiology*, **1996**, 29, 213-231.
- [214] B. Lee, R. Scopelliti and K. Severin, **A molecular probe for the optical detection of biogenic amines**, *Chemical Communications*, **2011**, 47, 9639-9641.
- [215] D. Valero, D. Martinez-Romero and M. Serrano, **The role of polyamines in the improvement of the shelf life of fruit**, *Trends in Food Science and Technology*, **2002**, 13, 228-234.
- [216] A. Onal, **A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods**, *Food Chemistry*, **2007**, 103, 1475-1486.
- [217] L. Prester, **Biogenic amines in fish, fish products and shellfish: a review**, *Food Additives & Contaminants: Part A*, **2011**, 28, 1547-1560.
- [218] D. Restuccia, U. G. Spizzirri, F. Puoci, G. Cirillo, M. Curcio, O. I. Parisi, F. Iemma and N. Picci, **A new method for the determination of biogenic amines in cheese by LC with evaporative light scattering detector**, *Talanta*, **2011**, 85, 363-369.
- [219] R. Talon and S. Leroy, **Diversity and safety hazards of bacteria involved in meat fermentations**, *Meat Science, 57th International Congress of Meat Science and Technology*, **2011**, 89, 303-309.
- [220] J. Karovicová and Z. Kohajdová, **Biogenic amines in food**, *Chemical Papers*, **2005**, 59, 70-79.
- [221] H. K. Mayer, G. Fiechter and E. Fischer, **A new ultra-pressure liquid chromatography method for the determination of biogenic amines in cheese**, *Journal of Chromatography A, 34th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques*, **2010**, 1217, 3251-3257.
- [222] L. Beneduce, A. Romano, V. Capozzi, P. Lucas, L. Barnavon, B. Bach, P. Vuchot, F. Grieco and G. Spano, **Biogenic amine in wines**, *Annals of Microbiology*, **2010**, 60, 573-578.
- [223] S. Mangani, S. Guerrini, L. Granchi and M. Vincenzini, **Putrescine Accumulation in Wine: Role of *Oenococcus oeni***, *Current Microbiology*, **2005**, 51, 6-10.
- [224] D. Weschsler, B. Walther, E. Jakob and H. Winkler, **Importance des amines biogènes dans l'alimentation et présence dans les différents fromages**, *ALP forum 2009 n°73 f*, **2009**,
- [225] J. M. Landete, B. de las Rivas, A. Marcobal and M. Rosario, **Molecular methods for the detection of biogenic amine-producing bacteria on foods**, *International Journal of Food Microbiology*, **2007**, 117, 258-269.
- [226] <http://www.azaquar.com/>
- [227] A. Gugliucci, **Polyamines as clinical laboratory tools**, *Clinica Chimica Acta*, **2004**, 344, 23-35.
- [228] A. Marcobal, B. de las Rivas and R. Munoz, **Methods for the Detection of Bacteria Producing Biogenic Amines on Foods: A Survey**, *Journal fur Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, **2006**, 1, 187-196.

-
- [229] J. J. Lapa-Guimaraes and J. Pickova, **New solvent systems for thin-layer chromatographic determination of nine biogenic amines in fish and squid**, *Journal of Chromatography A*, **2004**, *1045*, 223-232.
- [230] W. H. A. de Jong, E. G. E. de Vries and I. P. Kema, **Current status and future developments of LC-MS/MS in clinical chemistry for quantification of biogenic amines**, *Clinical Biochemistry Mass Spectrometry in Laboratory Medicine*, **2011**, *44*, 95-103.
- [231] S. Bomke, B. Seiwert, L. Dudek, S. Effkemann and U. Karst, **Determination of biogenic amines in food samples using derivatization followed by liquid chromatography/mass spectrometry**, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2009**, *393*, 247-256.
- [232] H. S. Marks (Rupp) and C. R. Anderson, **Determination of putrescine and cadaverine in seafood (finfish and shellfish) by liquid chromatography using pyrene excimer fluorescence**, *Journal of Chromatography A*, **2005**, *1094*, 60-69.
- [233] R. J. Slingerland, A. B. P. Van Kuilenburg, J. M. Bodlaender, H. Overmars, P. A. Voute and A. H. Van Gennip, **High-performance liquid chromatographic analysis of biogenic amines in cells and in culture media using on-line dialysis and trace enrichment**, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, **1998**, *716*, 65-75.
- [234] S. Becker, L. Kortz, C. Helmschrodt, J. Thiery and U. Ceglarek, **LC-MS-based metabolomics in the clinical laboratory**, *Journal of Chromatography B: LC-MS/MS in Clinical Chemistry*, **2012**, *883-884*, 68-75.
- [235] S. Millan, M. C. Sampedro, N. Unceta, M. A. Goicolea and R. J. Barrio, **Simple and rapid determination of biogenic amines in wine by liquid chromatography-electrospray ionization ion trap mass spectrometry**, *Analytica Chimica Acta*, **2007**, *584*, 145-152.
- [236] X. Sun, X. Yang and E. Wang, **Determination of biogenic amines by capillary electrophoresis with pulsed amperometric detection**, *Journal of Chromatography A*, **2003**, *1005*, 189-195.
- [237] F. Kvasnicka and M. Voldrich, **Determination of biogenic amines by capillary zone electrophoresis with conductometric detection**, *Journal of Chromatography A*, **2006**, *1103*, 145-149.
- [238] M. Castro-Puyana, V. Garcia-Canas, C. Simo and A. Cifuentes, **Recent advances in the application of capillary electromigration methods for food analysis and Foodomics**, *Electrophoresis*, **2012**, *33*, 147-167.
- [239] L. L. M. Ravelo-Perez, M. Asensio-Ramos, J. Hernandez-Borges and M. A. Rodriguez-Delgado, **Recent food safety and food quality applications of CE-MS**, *Electrophoresis*, **2009**, *30*, 1624-1646.
- [240] K. Punakivi, M. Smolander, M.-L. Niku-Paavola, J. Mattinen and J. Buchert, **Enzymatic determination of biogenic amines with transglutaminase**, *Talanta*, **2006**, *68*, 1040-1045.
- [241] M. Vlckova and M. A. Schwarz, **Enzymatic sensitivity enhancement of biogenic monoamines on a chip**, *Electrophoresis*, **2005**, *26*, 2701-2707.

-
- [242] S. Piermarini, G. Volpe, R. Federico, D. Moscone and G. Palleschi, **Detection of Biogenic Amines in Human Saliva Using a Screen-Printed Biosensor**, *Analytical Letters*, **2010**, *43*, 1310-1316.
- [243] M. Venza, M. Visalli, D. Cicciu and D. Teti, **Determination of polyamines in human saliva by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection**, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, **2001**, *757*, 111-117.
- [244] J. Sun, H.-X. Guo, D. Semin and J. Cheetham, **Direct separation and detection of biogenic amines by ion-pair liquid chromatography with chemiluminescent nitrogen detector**, *Journal of Chromatography A*, **2011**, *1218*, 4689-4697.
- [245] L. Kang, J. You, Z. Sun, C. Wang, Z. Ji, Y. Gao, Y. Suo and Y. Li, **LC Determination of Trace Biogenic Amines in Foods Samples with Fluorescence Detection and MS Identification**, *Chromatographia*, **2011**, *73*, 43-50.
- [246] S. Hernandez-Cassou and J. Saurina, **Derivatization strategies for the determination of biogenic amines in wines by chromatographic and electrophoretic techniques**, *Journal of Chromatography B*, **2011**, *879*, 1270-1281.
- [247] O. Busto, M. Miracle, J. Guasch and F. Borrull, **Determination of biogenic amines in wines by high-performance liquid chromatography with on-column fluorescence derivatization**, *Journal of Chromatography A*, **1997**, *757*, 311-318.
- [248] A. R. Shalaby, **Multidetector, semiquantitative method for determining biogenic amines in foods**, *Food Chemistry*, **1995**, *52*, 367-372.
- [249] C.-F. Chow, H.-K. Kong, S.-W. Leung, B. K. W. Chiu, C.-K. Koo, E. N. Y. Lei, M. H. W. Lam, W.-T. Wong and W.-Y. Wong, **Heterobimetallic Ru(II)-Eu(III) Complex as Chemodosimeter for Selective Biogenic Amine Odorants Detection in Fish Sample**, *Analytical Chemistry*, **2010**, *83*, 289-296.
- [250] Q.-N. Guo, Z.-Y. Li, W.-H. Chan, K.-C. Lau and M. J. Crossley, **Appending zinc tetraphenylporphyrin with an amine receptor at β -pyrrolic carbon for designing a selective histamine chemosensor**, *Supramolecular Chemistry*, **2010**, *22*, 122-129.
- [251] M. Niculescu, C. Nistor, I. Frébort, P. Pec, B. Mattiasson and E. Csoregi, **Redox Hydrogel-Based Amperometric Bionzyme Electrodes for Fish Freshness Monitoring**, *Analytical Chemistry*, **2000**, *72*, 1591-1597.
- [252] M. Ikeda, T. Yoshii, T. Matsui, T. Tanida, H. Komatsu and I. Hamachi, **Montmorillonite-Supramolecular Hydrogel Hybrid for Fluorocolorimetric Sensing of Polyamines**, *Journal of the American Chemical Society*, **2011**, *133*, 1670-1673.
- [253] J. Lange and C. Wittmann, **Enzyme sensor array for the determination of biogenic amines in food samples**, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2002**, *372*, 276-283.
- [254] N. A. Rakow, A. Sen, M. C. Janzen, J. B. Ponder and K. S. Suslick, **Molecular Recognition and Discrimination of Amines with a Colorimetric Array**, *Angewandte Chemie*, **2005**, *44*, 4538-4532.
- [255] G. Lu, J. E. Grossman and J. B. Lambert, **General but Discriminating Fluorescent Chemosensor for Aliphatic Amines**, *Journal of Organic Chemistry*, **2006**, *71*, 1769-1776.

-
- [256] S. Korsten and G. J. Mohr, **Star-Shaped Tripodal Chemosensors for the Detection of Aliphatic Amines**, *Chemistry A European Journal*, **2011**, *17*, 969-975.
- [257] M.-S. Steiner, R. J. Meier, A. Duerkop and O. S. Wolfbeis, **Chromogenic Sensing of Biogenic Amines Using a Chameleon Probe and the Red-Green-Blue Readout of Digital Camera Images**, *Analytical Chemistry*, **2010**, *82*, 8402-8405.
- [258] S. Tombelli and M. Mascini, **Electrochemical biosensors for biogenic amines: a comparison between different approaches**, *Analytica Chimica Acta*, **1998**, *358*, 277-284.
- [259] M. C. Blanco-Lopez, M. J. Lobo-Castanon, A. J. Miranda-Ordieres and P. Tunon-Blanco, **Electrochemical sensors based on molecularly imprinted polymers**, *Trends in Analytical Chemistry*, **2004**, *23*, 36-48.
- [260] J. T. English, B. A. Deore and M. S. Freund, **Biogenic amine vapour detection using poly(anilineboronic acid) films**, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **2006**, *115*, 666-671.
- [261] <http://www.bio-logic.info/index.html>
- [262] T. Sato, T. Horiuchi and I. Nishimura, **Simple and rapid determination of histamine in food using a new histamine dehydrogenase from *Rhizobium sp.***, *Analytical Biochemistry*, **2005**, *346*, 320-326.
- [263] K. Miyachi, K. Moriyama, T. Yamaguchi, H. Tominaga, S. Kamino and Y. Fujita, **Spectrophotometric Determination of Spermine and Related Compounds Using o-Hydroxyhydroquinonephthalein and Manganese(II)**, *Analytical Sciences*, **2007**, *23*, 1103-1107.
- [264] B. Bao, L. Yuwen, X. Zheng, L. Weng, X. Zhu, X. Zhan and L. Wang, **A fluorescent conjugated polymer for trace detection of diamines and biogenic polyamines**, *Journal of Materials Chemistry*, **2010**, *20*, 9628-9634.
- [265] S. Oguri, A. Mizusawa, M. Kamada and M. Kohori, **A new method of histamine colorimetry using 2,3-naphthalenedicarboxaldehyde on a silica-gel column cartridge**, *Analytica Chimica Acta*, **2006**, *558*, 326-331.
- [266] S. Subramanian, **Specific Interaction of Spermine with Cibacron Blue F3GA**, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **1982**, *217*, 388-391.
- [267] G. Lu, J. E. Grossman and J. B. Lambert, **General but Discriminating Fluorescent Chemosensor for Aliphatic Amines**, *Journal of Organic Chemistry*, **2006**, *71*, 1769-1776.
- [268] M. Comes, M. D. Marcos, R. Martinez-Mañez, F. Sancenon, J. Soto, L. A. Villaescusa, P. Amoros and D. Beltran, **Chromogenic discrimination of primary aliphatic amines in water with functionalized mesoporous silica**, *Advanced Materials*, **2004**, *16*, 1783-1786.
- [269] Z. D. Hill and P. MacCarthy, **Novel approach to Job's methods, an undergraduated experiment**, *Journal of Chemical Education*, **1986**, *63*, 162.
- [270] *National Bureau of Standards*, **1980**, *Special Publication 260-64*, p.32.
- [271] B. Valeur, *Invitation à la fluorescence moléculaire*, **2004**, Edition de Boeck, ISBN 2-8041-4597-2.
- [272] <http://macro.lsu.edu/HowTo/solvents/Refractive%20Index.htm>
- [273] <http://www.refractometer.pl/refraction-datasheet-sulfuric-acid>

-
- [274] R. Dagnelie **Développement d'un capteur chimique de polluants atmosphériques à transduction optique et à base de matériaux nanoporeux. Application à la détection des composés carbonylés pour le contrôle de la qualité de l'air**, thèse soutenue le 5 octobre 2009.
- [275] E. W. Frampton and L. Restaino, **Methods for Escherichia coli identification in food, water and clinical samples based on beta-glucuronidase detection**, *Journal of Applied Bacteriology*, **1993**, 74, 223-233.
- [276] Catalogue de substrats commercialisés par ACROS-ORGANICS – Biochimie et Immunologie
(http://www.brunschwigch.com/pdf/downloads/ACBC_Info_Substrates.pdf?PHPSESSID=b0c74d8a634e376ad48f782bc9bc432e)
- [277] G. G. Guilbault and A. Vaughan, **Naphthol as phosphates as fluorometric substrates for alkaline phosphatase**, *Analytical Letters*, **1970**, 3, 1-9.
- [278] **Apparatus for detecting biological activity.**, Waters, J. R., *United States Patent*, **1972**, 3 676 679.
- [279] D. A. Peura, D. J. Pambianco, K. R. Dye, C. Lind, H. Frierson, S. R. Hoffman, M. J. Combs, E. Guilfoyle and B. J. Marshall, **Microdose 14C-Urea Breath Test Offers Diagnosis of Helicobacter pylori in 10 Minutes**, *The American Journal of Gastroenterology*, **1996**, 91, 233-238.
- [280] E. Tortoli, F. Mandler, M. Tronci, E. Penati, G. Sbaraglia, D. Costa, G. Montini, M. Predorninato, R. Riva, C. P. Tosi, C. Piersirnonil and P. Urbano, **Multicenter evaluation of mycobacteria growth indicator tube (MGIT) compared with the BACTEC radiometric method, BBL biphasic growth medium and Lowenstein-Jensen medium**, *Clinical Microbiology and Infection*, **1997**, 3, 468-473.
- [281] K. S. Suslick, K. I. Hulkower, A. Sen, M. A. Sroka and W. B. McNamara, **Methods and apparatus for detecting ammonia from exhaled breath**, *United States Patent*, US2005/0171449A1, **2005**,
- [282] A. P. Snyder, M. Miller, D. B. Shoff, G. A. Eiceman, D. A. Blyth and J. A. Parsons, **Enzyme-Substrate Assay for the Qualitative Detection of Microorganisms by Ion Mobility Spectrometry**, *Journal of Microbiological Methods*, **1991**, 14, 21-32.
- [283] C. Muller-Serieys, E. Bergogne-Bérézin, **Actualités sur l'hémoculture**, *La Presse Médicale*, **2002**, 31, 27-32.
- [284] Perks, H. M.; Ahnell, J. E. and McCarthy, L. R., **Identification of microorganisms by infrared analysis of evolved carbon dioxide**, *European Patent*, **1988**, 0 151 855.
- [285] Courcol, R. J.; Duhamel, M.; Decoster, A.; Lemaire, V.; Rastorgoueff, M. L.; Ochin, D. and Martin, G. R., **BioArgos: a Fully Automated Blood Culture System**, *Journal of Clinical Microbiology*, **1992**, 30, 1995-1998.
- [286] Turner, J.; Thorpe, T.; Guiseppi, J. D. and Driscoll, R., **Device for detecting microorganisms** *United States Patent*, **1990**, 4 945 060.

-
- [287] Wilson, M. L.; Mirrett, S.; McDonald, L. C.; Weinstein, M. P.; Fune, J. and Reller, L. B., **Controlled Clinical Comparison of bioMérieux VITAL and BACTEC NR-660 Blood Culture Systems for Detection of Bacteremia and Fungemia in Adults**, *Journal of Clinical Microbiology*, **1999**, *37*, 1709-1713.
- [288] Nolte, F. S.; Williams, J. M.; Jerris, R. C.; Morello, J. A.; Leitch, C. D.; Matushek, S.; Schwabe, L. D.; Dorigan, F. and Kocka, F. E., **Multicenter Clinical Evaluation of a Continuous Monitoring Blood Culture System Using Fluorescent-Sensor Technology (BACTEC 9240)**, *Journal of Clinical Microbiology*, **1993**, *31*, 552-557.
- [289] Carr A.H., **Micro-organism growth**, *International Patent*, **1993**, WO 94/19450
- [290] J.C Palomino ; A. Martin , A.V. Groll and F. Portaels, **Rapid culture-based methods for drug-resistance detection in Mycobacterium tuberculosis**, *Journal of Microbiological methods*, **2008**, *75*, 161-166. P. Zwadyk, C.L. Pierson and C. Young, **Comparison of Difco ESP and Organon Teknika BacT/Alert continuous monitoring blood culture systems**, *Journal of Clinical Microbiology*, **1994**, *32*, 1273-1279.
- [291] **Method and apparatus for detecting bacteria using a blood culture froth**, Berndt, K. W., *United States Patent*, **1998**, 5 770 394.
- [292] <http://www.soins-infirmiers.com/septicemie.php>
- [293] J. M. Janda and S. L. Abbott, **The Genus Aeromonas: Taxonomy, Pathogenicity, and Infection**, *Clinical Microbiology Reviews*, **2010**, *23*, 35-73.
- [294] P. Lykos, P. H. Patel, C. Morong and A. Joseph, **Rapid Detection of Bacteria from Blood Culture by an Electronic Nose**, *The Journal of Microbiology*, **2001**, *39*, 213-218.
- [295] S. F. Dealler, **Chromogenic and fluorogenic indicators and substrates in diagnostic microbiology**, *Reviews in Medical Microbiology*, **1993**, *4*, 198-206.
- [296] R. J. Anderson, P. W. Groundwater, Y. Huang, A. L. James, S. Orenge, A. Rigby, C. Roger-Dalbert and J. D. Perry, **Synthesis and evaluation of novel chromogenic peptidase substrates based on 9-(40-aminophenyl)-10-methylacridinium salts as diagnostic tools in clinical bacteriology**, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2008**, *18*, 832-835.
- [297] M. Manafi, W. Kneifel, **Rapid methods for differentiating Gram-positive from Gram-negative aerobic and facultative anaerobic bacteria**, *Journal of Applied Bacteriology*, **1990**, *69*, 822-827
- [298] Guillemot, L.H. ; Dupoy, M. ; Maroux, P.R. ; Tran-Thi, T.T. ; **Détection de métabolites gazeux exogènes issus de micro-organismes pathogènes. Application aux automates pour hémocultures et pour mycobactéries**, FR1155690, 27/06/2011
- [299] A. P. Snyder, M. Miller, D. B. Shoff, G. A. Eiceman, D. A. Blyth and J. A. Parsons, **Enzyme-Substrate Assay for the Qualitative Detection of Microorganisms by Ion Mobility Spectrometry**, *Journal of Microbiological Methods*, **1991**, *14*, 21-32.
- [300] Ando, R. A.; Borin, A. C. and Santos, P. S., **Saturation of the electron-withdrawing capability of the NO₂ group in nitroaromatic anions: Spectroscopic and quantum-Chemical evidence**, *Journal of Physical Chemistry*, **2007**, *111*, 7194-7199.

-
- [301] W. Zhang, C. R. Wilson and N. D. Danielson, **Indirect fluorescent determination of selected nitro aromatic and pharmaceutical compounds via UV-photolysis of 2-phenylbenzimidazole-5-sulfonate**, *Talanta*, **2008**, *74*, 1400-1407.
- [302] R. Sander, **Compilation of Henry's Law Constants for Inorganic and Organic Species of Potential Importance in Environmental Chemistry (Version 3)**, 1999, <http://www.henryslaw.org>
- [303] Wilson, M. J. R. and Hensch, L. L., **Processing of gel-silica monoliths for optics. Drying behavior of small pore gels**, *Journal of Non-Crystalline Solids*, **1990**, *121*, 234-243.
- [304] Y. Kohno, J. Kamiya, T. Okubo and R. Matsushima, **Color Sensors for Indole Vapors Based on Ehrlich-type Reactions**, *Analytical Sciences*, **2009**, *25*, 129-132.
- [305] M.-L. Calvo-Muñoz, T.-T. Truong and T.-H. Tran-Thi, **Chemical sensors of monocyclic aromatic hydrocarbons based on sol-gel materials : kinetics of trapping of the pollutants and sensitivity of the sensor**, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **2002**, *87*, 173-183.
- [306] P. R. Marcoux, M. Dupoy, R. Mathey, A. Novelli-Rousseau, V. Heran, S. Morales, F. Rivera, P. L. Joly, J. P. Moy and F. Mallard, **Micro-confinement of bacteria into w/o emulsion droplets for rapid detection and enumeration**, *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects*, **2011**, *377*, 54-62.
- [307] V. Acosta-Martinez and M. A. Tabatabai, **Arylamidase Activity of Soils**, *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **2000**, *64*, 215-221.
- [308] C. Y. Doronin, R. K. Chernova and N. N. Gusakova, **4-dimethylaminocinnamaldehyde as a photometric reagent for primary aromatic amines**, *Journal of Analytical Chemistry*, **2004**, *59*, 335-344.
- [309] P. S. Riley and F. J. Behal, **Amino acid- β -naphthylamide hydrolysis by *Pseudomonas Aeruginosa* arylamidase**, *Journal of Bacteriology*, **1971**, *108*, 809-816.
- [310] Report on Carcinogens, Twelfth Edition (2011) 2-Naphthylamine, National Program, Department of Health and Human Services, p278-279, <http://ntp.niehs.nih.gov/go/roc12>
- [311] **Discriminating Bacteria With Functionalised Nanoporous Xerogels**, Crunaire, S.; Marcoux, P. R.; Guillemot, L.-H.; Ngoa, K.-Q.; Mallard, F.; Moy, J.-P. and Tran-Thi, T.-H., *Procedia Chemistry*, **2012**, *accepted in April 2012*.
- [312] G. L. Lombard and V. R. Dowell, **Comparison of three reagents for detecting indole production by anaerobic bacteria in microtest systems**, *Journal of Clinical Microbiology*, **1983**, *18*, 609-613.
- [313] US National library of medicine <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/chemidlite.jsp>
- [314] S. G. Schulman, **The acidity dependence of the fluorescence of β -naphthylamine**, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy*, **1972**, *28*, 1-4.
- [315] M. A. El-Bayoumi, J.-P. Dalle and M. F. O'Dwyer, **Fluorescence lifetimes of molecules that undergo large configurational changes upon excitation**, *Journal of The American Chemical Society*, **1970**, *92:11*, 3494-3495.

[316] J. Zeyer, H. P. Kocher and K. N. Timmis, **Influence of para-substituents on the oxidative metabolism of o-nitrophenols by *Pseudomonas putida* B2**, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **1986**, 52, 334-339.