

UNIVERSITE DU MAINE
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

THESE

Présentée par

LOUBNA BENDRIAA

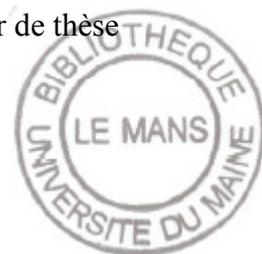
Pour l'obtention du
**Grade de Docteur
de l'Université du Maine**

Spécialité : Physique

**Etude et caractérisation de biocapteurs
bactériens luminescents pour la détection de
molécules et de microorganismes**

Soutenue le 11 juillet 2005, devant le jury composé de

M. B. Orsal	Professeur, Université de Montpellier II	Rapporteur
M. G.D. Sockalingum	MdC HDR, Université de Reims	Rapporteur
M. G. Thouand	Professeur, Université de Nantes	Président de jury
M. Ph. Cornet	Ingénieur, Société Biolumine SA	Examineur
M. Ph. Daniel	Professeur, Université du Maine	Directeur de thèse
M. P. Picart	MdC HDR, Université du Maine	Co-directeur de thèse





Remerciements

Ce travail de thèse a été encadré par Monsieur Philippe Daniel, Professeur au Laboratoire de Physique de l'Etat Condensé (LPEC) de l'Université du Maine et Monsieur Pascal Picart, Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Supérieure d'Ingénieurs du Mans (ENSIM).

Je tiens à leurs exprimer toute ma gratitude pour avoir accepté de m'encadrer durant ce travail de thèse. Je les remercie pour leur disponibilité, leurs précieux conseils, leur compréhension et leur gentillesse. Merci aussi pour leur attention bienveillante pendant la rédaction de ce manuscrit.

Je remercie Monsieur Gérald Thouand, coordinateur du projet de recherche « Biocapteurs Luminescents », pour son soutien et son attention pendant ces années de recherche. Merci aussi d'avoir accepté de participer au jury de soutenance de thèse.

Je tiens à remercier Monsieur B. Orsal et Monsieur G.D. Sockalingum d'avoir accepté d'évaluer ce manuscrit en tant que rapporteurs. Je remercie également Monsieur Ph. Cornet d'avoir accepté de participer au jury de soutenance de thèse.

Je souhaite remercier le Professeur M. Manfait pour son accueil au sein de l'unité MÉDIAN, CNRS UMR6142, pour effectuer des mesures en microscopie Raman.

Je remercie également Marie-José Durand, Denis Poncelet, Habib Horry, Thomas Charrier, Mimma Perneti, Patricia Vachon, Cyrille Chapeau, Jean Pierre Boileau et Isabelle Adt pour leur collaboration à ce travail de recherche.

Je remercie Madame Jeannette Lemoine et Monsieur Gilles Ripault pour leur aide précieuse, leur gentillesse et leur amitié.

J'adresse mes remerciements à l'ensemble du personnel de l'ENSIM et du Laboratoire PEC pour leur aide précieuse et leur gentillesse.

Je remercie toutes celles et ceux qui ont apporté leur contribution directe ou indirecte à mon travail et spécialement à ma sœur Farida, mes amis et mes collègues doctorants, en particulier Thomas, Ramzi, Huy, Marzouk et Julien.

Enfin, je suis infiniment reconnaissante à mes parents, pour la confiance qu'ils m'ont témoignée depuis toujours. Merci pour leur encouragement et leur soutien durant ces années de travail.





*A mes parents, sans eux ma vie ne serait pas ce qu'elle est aujourd'hui
A mon frère Marouane et mes soeurs*





Résumé

Les préoccupations sanitaires et environnementales sont devenues une des priorités de notre société. Dans le domaine alimentaire, la sécurité implique la détection et le dosage des éléments toxiques. Les méthodes actuelles sont efficaces mais nécessitent le plus souvent des équipements coûteux, du temps et du personnel qualifié. La mise au point de biocapteurs, simples d'utilisation, rapides et moins onéreux, permettrait d'améliorer les systèmes de détection. Ces dispositifs associent une partie biologique (microorganismes) avec une partie physique constituée d'un transducteur permettant de transformer le signal biologique en un signal électrique quantifiable. Ce dernier est proportionnel à la concentration du toxique biodisponible.

Dans ce contexte, le but de ce travail de thèse est la conception et la caractérisation de biocapteurs bactériens luminescents. Nous avons développé deux types de biocapteurs.

Lumisens I est un biocapteur monocanal en phase liquide. Il permet une mesure simultanée et *in situ* de la bioluminescence et de la densité optique. La validation expérimentale du concept a été effectuée avec la bactérie naturellement luminescente *Vibrio Fischeri*. Ce dispositif est dédié à la détection du tributylétain, polluant chimique, par utilisation comme bioélément de la bactérie *Escherichia coli TBT3* modifiée génétiquement et sensible à la présence du tributylétain. La limite de détection se situe à 0,125 μM .

Lumisens II est un biocapteur multicanal qui utilise des bactéries immobilisées sensibles à un ensemble de polluants. Avec la carte MBC, ce biocapteur permet de détecter jusqu'à 16 polluants (tributylétain, aluminium, chrome, mercure, arsenic, plomb,...etc) en disposant d'un ensemble de bactéries modifiées génétiquement spécifiques à ces substances.

La réponse de ces biocapteurs étant en étroite liaison avec l'état physiologique des bioéléments, une caractérisation spectroscopique des bactéries par diffusion Raman a été menée. Nous avons étudié l'évolution de l'état physiologique des bactéries en fonction du temps. Nous avons également travaillé sur l'effet du tributylétain sur la bactérie *Escherichia coli TBT3*. Il a été montré que l'on peut discerner une bactérie saine d'une bactérie exposée à des concentrations de tributylétain de 3 à 5 μM .

Nous avons également appliqué la technique de caractérisation spectroscopique à l'analyse de traces de tributylétain dans des peintures antisalissures. Le seuil de détection est estimé à une concentration volumique de 20 %. Cependant ce seuil de détection reste élevé par rapport aux biocapteurs qui ont été développés.

Mots clés

Biocapteur bactérien luminescent, bioluminescence, densité optique, bactéries luminescentes, tributylétain, spectroscopie Raman, analyse CHA, peinture antifouling.



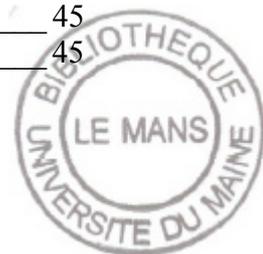


Table des matières

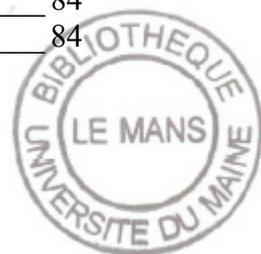




GLOSSAIRE	1
INTRODUCTION GENERALE	7
CHAPITRE I : GENERALITES	13
I. INTRODUCTION	15
II. BIOLUMINESCENCE	16
1. Introduction	16
2. La bioluminescence bactérienne	16
3. La souche Escherichia Coli TBT3	17
4. Emission spectrale des bactéries luminescentes	18
4.1. Problématique	18
4.2. dispositif expérimental	19
4.3. Résultats	20
4.4. Conclusion	22
5. Applications de la bioluminescence	23
III. BIOCAPTEURS	24
1. Qu'est ce qu'un biocapteur ?	24
2. Types de biocapteurs	25
3. Biocapteur bactérien luminescent	26
3.1. Intérêt	26
3.2. Pourquoi utiliser des bactéries luminescentes ?	26
3.3. Substance cibles	27
3.4. Caractéristiques cibles	28
IV. OBJECTIF DE LA THESE	28
1. Biocapteur lumisens I	28
2. Biocapteur Lumisens II	28
3. Caractérisation des bactéries par spectroscopie Raman	28
V. REFERENCES	30
CHAPITRE II : BIOCAPTEUR BACTERIEN LUMINESCENT : LUMISENS I	33
I. INTRODUCTION	35
II. PRINCIPE DE MESURE	37
1. Densité optique	37
1.1. Définition	37
1.2. Principe de mesure	37
1.3. Rapport signal sur bruit	39
2. Bioluminescence	45
2.1. Principe de mesure	45



2.2. Conditionnement du photomultiplicateur	46
2.3. Calcul de flux lumineux	47
2.4. Rapport signal sur bruit	50
III. BIOCAPTEUR LUMISENS I	53
1. Partie autoclavable	53
2. Partie non autoclavable	54
3. Système d'acquisition et traitement des données	55
IV. VALIDATION EXPERIMENTALE	59
1. Mesure simultanée de la bioluminescence et de la densité optique	59
1.1. Protocole	59
1.2. Préparation des bactéries et du milieu de culture	59
1.3. Mesure de bioluminescence	60
1.4. Mesure de la densité optique	61
2. Application de Lumisens I à la détection d'organo-étains	63
3. Effet de volume sur la luminance totale des bactéries	64
3.1. Objectif	64
3.2. Effet du volume de milieu réactionnel sur la luminance d'une réaction de bioluminescence	65
V. CONCLUSION	66
VI. REFERENCES	67
CHAPITRE III : BIOCAPTEUR LUMINESCENT MULTICANAL : LUMISENS II	69
I. INTRODUCTION	71
II. BIOCAPTEUR MULTICANAL LUMISENS II	72
1. Architecture	72
2. Choix du détecteur	74
3. Photométrie du capteur	76
4. Choix de la caméra	77
5. Carte Mini-Bio-Chip (MBC)	78
6. Immobilisation	80
III. TESTS DE VALIDATION	80
1. Objectifs	80
2. Préparation des bactéries	81
3. Protocole de mesure	81
4. TBT3 en phase immobilisée induite par le TBT	81
5. Effet de la concentration cellulaire	83
6. Conclusion	84
IV. PREMIERS ESSAIS AVEC LUMISENS II	84
1. Objectif	84
2. Carte MBC	84



3. Protocole de préparation des bactéries _____	85
4. Résultats expérimentaux _____	86
V. CONCLUSION _____	90
VI. REFERENCES _____	91
CHAPITRE IV : CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE PAR SPECTROSCOPIE RAMAN _____	93
I. INTRODUCTION _____	95
II. SPECTROSCOPIE RAMAN _____	95
1. Principe et domaines d'étude _____	95
2. Avantages et inconvénients de la technique de spectroscopie Raman _____	97
3. Mise en œuvre expérimentale _____	98
4. Application de la spectroscopie Raman aux milieux biologiques _____	100
III. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE SUR LA CARACTERISATION DES MICROORGANISMES PAR DIFFUSION RAMAN _____	101
1. Préparation des bactéries et choix du substrat _____	101
1.1. Préparation des bactéries _____	101
1.2. Choix du substrat _____	102
2. Analyse et caractérisation des bactéries avec excitation dans l'ultraviolet _____	102
3. Analyse et caractérisation des bactéries avec excitation dans l'infrarouge _____	104
4. Analyse et caractérisation des bactéries avec excitation dans le visible _____	105
5. Spectroscopie Raman SERS _____	106
6. Conclusion _____	107
IV. CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE DES BACTERIES PAR SPECTROSCOPIE RAMAN _____	109
1. Objectif _____	109
2. Etude en fonction des phases de croissance _____	109
2.1. Préparation des bactéries _____	109
2.2. Spectres Raman obtenus avec le T64000 _____	111
2.3. Spectres Raman obtenus avec le Labram _____	113
2.4. Analyse des spectres _____	114
2.5. Conclusion _____	117
3. Effet du tributylétain sur la bactérie <i>E.Coli TBT3</i> _____	117
3.1. Préparation des bactéries _____	117
3.2. Résultats expérimentaux _____	118
3.3. Analyse selon la CHA _____	118
3.4. Conclusion _____	120
4. Conclusion _____	121



V. ANALYSE DE TRACES DE TBT DANS DES PEINTURES ANTIFOULING PAR SPECTROSCOPIE RAMAN	121
1. Introduction	121
2. Objectif	122
3. Analyse de la molécule $(C_4H_9)_3SnCl$	123
4. Etude expérimentale de la molécule de tributylétain	124
5. Détection du TBT dans les peintures antifouling	127
6. Limite de détection du TBT dans les peintures	129
7. Conclusion	131
VI. CONCLUSION	132
VII. REFERENCES	133
CONCLUSION GENERALE	137



Glossaire





- **Bactérie Gram+ et Gram-**

On distingue les bactéries selon leur paroi : Gram+ et Gram-. La paroi des bactéries Gram+ est 1000 fois plus épaisse que celle des Gram-. La paroi des bactéries Gram+ est généralement composée de peptidoglycane. Ce dernier représente 50% du poids de la paroi structurée.

La paroi des bactéries Gram- est composée, sur la membrane externe, de lipoprotéines, de lipopolysaccharides et de trimères. Dans les parois de Gram-, on trouve plus d'acides aminés et de lipides.

- **Biodisponibilité**

La biodisponibilité est l'aptitude d'une substance chimique à atteindre sa cible organique. Ce concept très général intègre tous les phénomènes mis en jeu depuis la pénétration de l'agent dangereux dans un organisme vivant jusqu'à son métabolisme, son élimination ou son stockage. Le terme biodisponible est utilisé pour une substance qui peut être absorbée par les organismes vivants.

- **Biofilm**

Un biofilm est une couche de micro-organismes, contenu dans une matrice solide, se formant sur des surfaces en contact avec de l'eau. L'intégration d'organismes pathogènes dans les biofilms peut les protéger de l'action de biocides, à haute concentration, qui les auraient détruits ou inactivés sans cela.

Les biofilms constituent des refuges sûrs pour les micro-organismes tels *Escherichia Coli* ou *Listéria*, où ils peuvent se reproduire.

- **Boîte de Pétri**

C'est un récipient circulaire, en matière transparente synthétique, recouvert par un couvercle de même forme et de dimension légèrement supérieure. Elle permet la culture des cellules en vue d'une multiplication.

- **Colonie**

C'est un ensemble de bactéries se développant sur une surface solide comme celle d'un milieu de culture gélosé, souvent visible à l'oeil nu mais pouvant aussi être microscopique. En théorie la colonie provient d'une seule cellule mère. L'accumulation des cellules au même point rend l'agrégat de cellules visible à l'oeil nu. Une colonie dérivant d'une seule cellule a une bonne probabilité d'être formée de cellules génétiquement homogènes.

- **Culture en continu**

La culture en continu est une technique de culture bactérienne. La souche est introduite dans un bioréacteur réunissant toutes les conditions de croissance (aération, pH, température,...) et après la phase d'adaptation de la souche, un débit constant de milieu de culture est ajouté dans le réacteur par pompage. Afin de maintenir un volume constant, un système à pompage en sortie assure la récupération du surplus volumique. Cette technique est utilisée en microbiologie pour sa capacité à maintenir une culture en phase de croissance.

- **Culture en batch**

C'est également une technique de culture bactérienne mais contrairement à la culture en continu, la culture en batch est réalisée sans renouvellement du milieu de culture, avec une agitation. Dans un système de production en batch, on distingue trois phases de croissance distinctes :

- Phase de latence : les bactéries sont en phase d'adaptation avec le milieu de culture, le temps d'adaptation peut être assez long.
- Phase exponentielle : les cellules se divisent activement et utilisent tous les nutriments mis à leur disposition. Cette phase est la plus courte.
- Phase stationnaire : après la phase exponentielle, le milieu devient de moins en moins favorable aux divisions cellulaires car un des facteurs de croissance commence à manquer (O_2 par exemple) ou par accumulation de déchets toxiques. Pendant cette phase, le nombre de cellules reste constant, les cellules vieillissent en absence de toutes divisions, leur état physiologique change et elles meurent.

- **Equilibre dynamique**

Dans une culture en continu, on atteint un équilibre dynamique lorsque le nombre de cellules qui quittent le bioréacteur est égal au nombre de cellules présentes dans le réacteur : la densité cellulaire reste constante au cours du temps.

- **Gènes luxAB**

Dans une bactérie luminescente, le gène lux est responsable de la réaction lumineuse. Les gènes luxAB est composé du gène luxA et du gène luxB qui ensemble produisent un signal lumineux large bande dans le visible avec un maximum autour de 498 nm. Toutefois, pour accomplir entièrement la réaction lumineuse, un substrat doit être fourni à la cellule. Pratiquement, on le réalise en ajoutant un produit chimique à une certaine phase de la réaction biologique.

- **Luciférase**

La luciférase est un nom générique donné à une enzyme qui catalyse la réaction lumineuse. On peut la trouver dans les bactéries, les algues, les insectes, les crevettes et les calamars. La lumière qu'elle produit dans ces organismes est bien connue : c'est le phénomène de bioluminescence.

- **Over-night**

Ce terme signifie culture des bactéries en batch pendant toute une nuit (12 heures environ).

- **Plasmides**

Ce sont des molécules d'ADN double brin, circulaires, qui, extrachromosomiques, ne constituent pas le génome bactérien. Ils ont une réplication autonome, une petite taille et

codent pour une information génétique non-indispensable. Ils peuvent infecter des bactéries ou être échangés entre elles.

- **Taux de dilution**

Le taux de dilution, noté D , généralement exprimé en min^{-1} , représente le taux d'approvisionnement et d'appauvrissement du milieu d'une culture en continu. Le taux de dilution contrôle le taux de croissance microbienne dans une culture en continu.





Introduction générale





Dans le domaine de l'agroalimentaire, le contrôle de la qualité et l'hygiène sont des paramètres systématiquement pris en compte par les acteurs économiques. Les défis majeurs apparus récemment tels que l'impact industriel sur l'environnement et les risques pour la santé vont conduire les consommateurs à exiger de nouveaux systèmes de production, de nouveaux produits et l'application du principe de précaution. L'application de ce principe va inévitablement mener à l'intensification de l'utilisation des systèmes de mesures, de contrôles et d'estimation des impacts des activités économiques sur l'environnement naturel et la santé humaine. Parmi les procédés, les biocapteurs apparaissent à fort potentiel. Dans ce contexte l'Université de Nantes pilote le projet de recherche DETEXLUB (Détection de Xénobiotique par Luminescence Bactérienne). Ce projet a pour objectif de lever deux verrous technologiques qui préoccupent les collectivités locales de la Région des Pays de la Loire et les industriels de l'agro-alimentaire :

- la détection de substances toxiques dans l'environnement : les perturbations imputables aux activités humaines sont nombreuses et comprennent des molécules organiques xénobiotiques (triazines, benzène,...), des métaux et des organométalliques (tributyl-étain, ...). Les méthodes d'évaluation de l'impact des xénobiotiques sont actuellement en plein développement. L'utilisation d'indicateurs biologiques sensibles et la recherche de biomarqueurs d'effets écotoxicologiques sur des espèces cibles permettent d'évaluer une perturbation globale des écosystèmes mais ne renseignent pas sur le type de pollution. Parallèlement à ces méthodes de détection globale, la recherche et l'évaluation des concentrations de composés spécifiques est nécessaire. Cependant, le coût élevé des techniques chimiques classiques de détection des xénobiotiques et des métaux entrave le suivi optimal de ces pollutions.
- la détection d'agents pathogènes en agroalimentaire : la maîtrise des risques d'intoxications alimentaires s'inscrit dans les enjeux industriels et nationaux. Les maladies infectieuses comptent pour 40% des 50 millions de décès recensés chaque année dans le monde. Parmi ces maladies, de nombreuses infections d'origine alimentaire ont pour origine des bactéries comme *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* 0157H7, *Salmonella typhimurium* ou *Campylobacter jejuni*. La législation impose aux industriels de vérifier le niveau sanitaire de leurs produits et de leurs stocks en réalisant des mesures systématiques de la présence de différents pathogènes. A titre d'exemple, le nombre de tests pour la détection de *Salmonella* s'élève à 5 millions par an aux Etats Unis. Ces analyses systématiques sur les produits finis ont un coût élevé qui pénalisent souvent les entreprises consacrant chaque année entre 1,5 et 2% de leur chiffre d'affaire dans le contrôle qualité.

Le projet DETEXLUB est né en 1998 sur une idée du Professeur G. Thouand qui côtoyait des microbiologistes travaillant sur les bactéries luminescentes et leur génétique à l'Université McGill au Canada. Les collectivités locales, dont la Région des Pays de la Loire, ont été sensibilisées par le projet porté par G. Thouand. Par ailleurs, ce projet n'a de sens qu'en lien direct avec le milieu industriel, c'est pourquoi Biolumine SA, société de biotechnologie, s'y est également impliquée. Cette société souhaite commercialiser les biocapteurs issus du programme de recherche technologique. Ces travaux sont effectués dans le cadre d'un Contrat Etat Région 2000-2006 (« Biocapteurs luminescents » référence N°18035 coordinateur Professeur G. Thouand) et répondent à l'esprit de tout laboratoire de recherche universitaire mais aussi au besoin de transfert de technologies vers Biolumine SA qui développera les biocapteurs.



Le projet est pluridisciplinaire, alliant des mesures physiques et biologiques, et il associe le Laboratoire PEC (**Physique de l'État Condensé** UMR CNRS 6087, au Mans), le Laboratoire CBAC (**Capteurs Bactériens pour l'Analyse et le Contrôle** à l'IUT de la Roche/Yon) et l'entreprise Biolumine SA. La répartition des compétences est la suivante :

- les producteurs de souches bactériennes et les biotechnologistes qui cultivent les bactéries sont à l'IUT de la Roche/Yon (génie microbien, écotoxicologie) : ils développent et mettent au point de nouveaux outils génétiques pour obtenir des bactéries et des bactériophages bioluminescents (appelés bioéléments), ils assurent l'étude de la physiologie des bactéries luminescentes et mettent au point le biocapteur;
- la conception technologique de l'appareillage de mesure de la lumière et l'analyse des bactéries par le Laboratoire PEC : l'implication du laboratoire se situe au niveau de l'étude des signaux lumineux émis par les bactéries et de leur physiologie, de l'ingénierie autour du procédé physique de mesure;
- le développement sera assuré après transfert technologique par la société Biolumine SA.

Actuellement le projet de recherche est orienté suivant deux axes. Le premier concerne la détection de tributylétain (TBT) dans l'environnement; le second vise à la détection des bactéries pathogènes telles que *Salmonella* et *Listeria*.

Dans ce contexte, le but de ce travail de thèse est le développement de biocapteurs répondant à un cahier des charges bien défini. Les biocapteurs sont parmi les technologies les plus prometteuses pour détecter des agents microbiens car ils peuvent être spécifiques et sensibles. Les biocapteurs que nous souhaitons développer utilisent des microorganismes bioluminescents. Ce travail de thèse s'intègre dans cette recherche à caractère transversal et il contribue à la mise au point et au développement de la partie physique des biocapteurs.

Ce manuscrit s'articule autour de quatre chapitres :

Nous présenterons dans le premier chapitre de ce mémoire les définitions de base concernant le principe de la bioluminescence. Il sera présenté les biocapteurs en général, leur principe de fonctionnement et leurs avantages, en particuliers les biocapteurs bactériens bioluminescents.

Le second chapitre est consacré à la présentation du premier biocapteur bactérien bioluminescent que nous avons mis au point. Ce biocapteur original a été baptisé **Lumisens I**. C'est un biocapteur en phase liquide, il permet une mesure simultanée et *in situ* de la bioluminescence et de la densité cellulaire qui est un paramètre pertinent en microbiologie. Nous présenterons son principe de mesure et les résultats de validation obtenus avec la bactérie *Vibrio Fischeri*. Ce biocapteur a été appliqué à la détection du tributylétain.

Dans le troisième chapitre, nous présenterons le deuxième biocapteur bactérien qui a été développé. Il s'agit de **Lumisens II**. C'est un biocapteur utilisant des bactéries immobilisées qui permet, contrairement au premier, la détection simultanée d'un ensemble de polluants, en utilisant une détection multicanale. Les premiers résultats de validation seront présentés.

Le quatrième et dernier chapitre est consacré à la caractérisation spectroscopique de microorganismes par diffusion Raman. En parallèle avec le développement des biocapteurs, nous nous sommes intéressés à la caractérisation de l'état physiologique des bactéries

luminescentes. Nous présenterons une synthèse bibliographique sur la caractérisation des microorganismes par diffusion Raman, les résultats expérimentaux obtenus lors d'une étude effectuée en fonction des phases de croissance. Nous présenterons aussi les résultats obtenus concernant l'effet du tributylétain sur la bactérie *E.Coli. TBT3*. Cette méthode spectroscopique a ensuite été appliquée à la détection de traces de TBT dans des peintures commerciales.

Une conclusion présentera le bilan de ce travail et dressera les perspectives envisagées pour la suite du programme de recherche.





Chapitre I
Généralités





I. Introduction

Les événements récents de contamination d'aliments par des germes pathogènes, tels que la *Listeria*, ont montré la nécessité de détecter et de doser sur des laps de temps très courts la présence de micro-organismes nocifs dans les aliments mais aussi de substances chimiques dans les chaînes de fabrication ou dans l'environnement. Ce défi technologique concernant la sécurité alimentaire des consommateurs, nécessite de disposer de capteurs et de moyens métrologiques alliant des mesures physiques et biologiques.

Les systèmes vivants, en particulier les micro-organismes, peuvent émettre des radiations lumineuses sous certaines conditions : bactéries ou virus luminescents, bactéries fluorescentes, microorganismes génétiquement modifiés par introduction d'un gène, virus ou autre. Aujourd'hui, ces microorganismes sont largement utilisés dans de nombreux domaines d'application comme le domaine de la santé, l'environnement ou l'agroalimentaire, notamment pour détecter la présence, l'absence et/ou la quantification de substances minérales, organiques ou d'organismes vivants dans des milieux liquides.

Dans le domaine de l'environnement, de tels organismes vivants émetteurs de lumière peuvent être utilisés pour la détection ou la quantification de substances organiques ou minérales, dans des eaux de sorties de station d'épuration ou de station de traitement des eaux, dans les eaux de piscine, dans les eaux de ports ou autres.

Dans le domaine de l'agroalimentaire, ces micro-organismes peuvent être utilisés pour la détection ou la quantification des bactéries pathogènes présentes dans les eaux de lavage.

Dans le domaine de la santé, ces organismes peuvent être utilisés pour la détection et/ou la quantification des bactéries de l'air, par remplacement de l'air filtré par de l'air ambiant non filtré et en contact avec le liquide du réacteur dans lequel se trouve un virus luminescent.

Toutefois, de tels organismes sont sensibles à différents paramètres tels que pH, oxygénation, composition du milieu de culture, etc.... En conséquence, la mesure de signaux lumineux de ces organismes ne peut être fiable que lorsque ces paramètres sont contrôlables. Par ailleurs, l'intensité des signaux lumineux émis est directement fonction du nombre d'organismes vivants dans le milieu de culture.

Dans ce chapitre introductif, nous rappellerons brièvement les notions de base nécessaires pour concevoir et optimiser un biocapteur bactérien luminescent :

- **La bioluminescence** : le principe de la bioluminescence est rappelé, en particulier la bioluminescence bactérienne qui nous intéresse pour ce travail. Les spectres d'émission seront présentés ainsi que différentes applications relatives à la bioluminescence.
- **Les biocapteurs** : nous rappellerons le principe de fonctionnement d'un biocapteur et donnerons quelques exemples de biocapteurs existants. Nous discuterons de l'intérêt des biocapteurs bactériens bioluminescents, sujet principal de ce travail de thèse.

Dans un troisième paragraphe, nous présenterons les objectifs de cette thèse : la conception et le développement de deux biocapteurs, nommés Lumisens I et Lumisens II, et la caractérisation physico-chimique des bactéries par spectroscopie Raman.

II. Bioluminescence

1. Introduction

La bioluminescence, historiquement appelée "lumière du vivant", est l'émission en continu de lumière visible par des organismes vivants. Cette propriété a intrigué de nombreux auteurs, dont les écrits relatent le phénomène depuis l'Antiquité. Il s'est ainsi accumulé d'importantes observations, les cas de bioluminescence étant très abondants. Chez les animaux, de très nombreuses classes d'invertébrés présentent le phénomène de bioluminescence, en revanche, chez les vertébrés seuls les poissons ont cette particularité. De plus, la luminescence est majoritairement représentée en milieu marin où, en profondeur, elle prend un caractère très commun puisque 95% des individus récoltés à -4000 mètres sont lumineux.

La lumière émise résulte de réactions chimiques modifiant les niveaux d'énergie d'une molécule susceptible d'avoir des transitions radiatives. La découverte du premier système chimique au XIX^e siècle, laissait supposer l'universalité du processus. Depuis, les recherches ont fait apparaître la grande diversité des structures biochimiques qui permettent cette émission.

Ces réactions se produisent dans des cellules ou des organes spécifiques. Si la morphologie et la position de ces organes sont extrêmement variables, en revanche, ceux-ci ne présentent que quelques types fonctionnels.

Ces organes sont sous la commande de mécanismes physiologiques assez divers. De nombreuses études ont tenté de dévoiler la part incombant à l'animal dans la régulation de sa bioluminescence.

Nous allons décrire dans les paragraphes suivants quelques caractéristiques essentielles de la bioluminescence bactérienne ainsi que des applications qui en découlent.

2. La bioluminescence bactérienne

La bioluminescence bactérienne est un phénomène naturel observé chez 11 espèces bactériennes regroupées dans 4 genres (*Vibrio*, *Photobacterium*, *Shewanella* (*Altermonas*) et *Photorhabdus* (*Xenorhabdus*)). Les trois premiers genres se trouvent en milieu marin, ils se développent sur le tube digestif de poissons marins ou sur la surface externe d'animaux marins. *Photorhabdus* se trouve en milieu terrestre[1].

La biologie moléculaire de la réaction et de ses régulations a été décrite par Meighen[2] pour les bactéries marines *Vibrio Harveyi*, *Vibrio Fischeri*, *Photobacterium Phosphoreum* et *Photobacterium Leiognathi*. Chez ces bactéries, la lumière dans le domaine visible (autour de 498 nm) est générée après une biochimie complexe codée par l'opéron *lux* qui produit l'enzyme clef de la réaction : la luciférase qui catalyse la réaction. Cette dernière est rappelée ci-dessous (figure 1.1) :



Figure 1.1 : Réaction biochimique conduisant à l'émission de lumière

Dans cette réaction, l'oxygène moléculaire, un aldéhyde à longue chaîne RCHO (Tétradécanal) ainsi que FMNH₂ sont les trois molécules clés dans le processus biochimique.

La figure 1.2 représente deux photos de la même boîte de pétri contenant la bactérie *Vibrio Harveyi* en milieu solide. La première photo prise en lumière du jour (A) et la seconde photo prise dans une pièce où doit être réalisée une obscurité totale (B). Cette bactérie est naturellement luminescente.

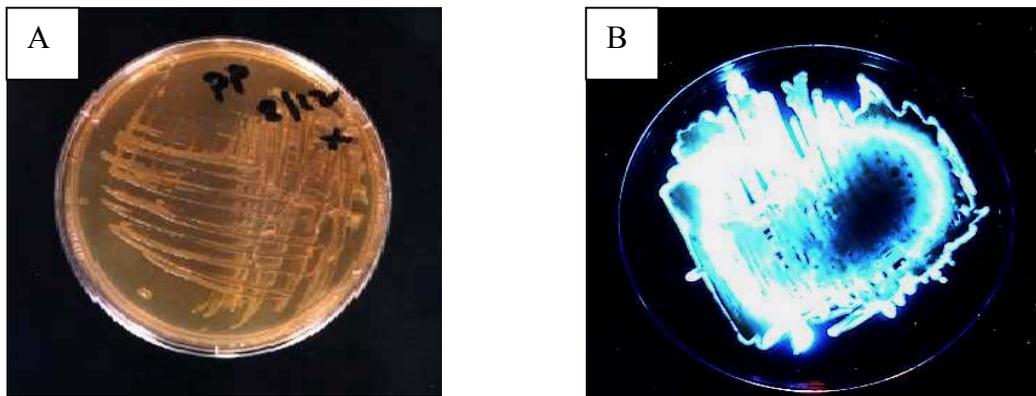


Figure 1.2 : *Vibrio Harveyi* sur milieu de culture solide
(A) : à la lumière du jour
(B) : en chambre noire

3. Souche *Escherichia coli* TBT3

Nous rappelons que le Tributyl-étain (TBT) est classé, selon la communauté européenne depuis 2001, parmi les substances dangereuses prioritaires (directive EEC no. 2455/2001/EC, 2001). Sa détection actuellement est très longue, coûteuse (environ 150 euros par analyse) et nécessite un personnel qualifié. En outre, les concentrations mesurées ne représentent pas la part réelle de TBT en contact avec les organismes (part biodisponible du composé). Cette cible a donc constitué un des axes principaux du programme de recherche. Ainsi une bactérie spécifique (TBT3) a été mise au point par l'équipe du professeur M.S. Dubow de l'Université Mc Gill à Montréal (Canada)[3].

La bactérie *Escherichia Coli* TBT3, sensible au Tributyl-étain (TBT), contient dans son chromosome le gène *luxAB* de *Vibrio Harveyi*. Cette souche appartient au genre *Escherichia* (bactérie Gram-), résistante à la tétracycline et à l'ampicilline. *Escherichia Coli* TBT3 est donc une bactérie modifiée génétiquement.

La méthode utilisée pour mettre au point cette bactérie sort du cadre de notre travail et a été décrite par MS Dubow en 1991[3]. En résumé, la méthode repose sur une insertion au hasard du gène dans la bactérie par un plasmide pFUSLUX et un screening des bactéries sur le composé à détecter pour la sélection des bactéries spécifiques[3]. Ainsi une banque d'environ 3000 clones est générée. Chaque clone a été soumis à la présence de TBT. L'un d'entre eux

était capable d'émettre de la lumière en présence du TBT : la bactérie TBT3. De part sa spécificité pour les organoétains, cette souche est unique parmi toutes les autres bactéries recombinantes luminescentes. Au contact de l'organoétain (partie biodisponible) à détecter, le promoteur du gène est induit et la luciférase est produite dans le cytoplasme de la bactérie, conduisant à une émission de lumière qui dépend de la concentration en substance.

La figure 1.3 présente un schéma simplifié d'induction de la luminescence chez *Escherichia coli* recombinante TBT3 (*E.coli* ::*lux AB*) par le tributyl-étain (TBT). Le gène *lux AB* code pour la synthèse de la luciférase (*lux AB*).

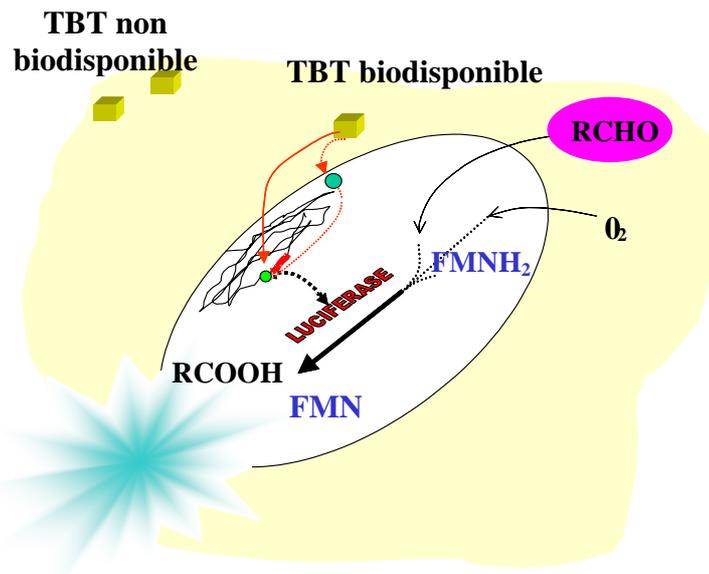


Figure 1.3 : Schéma simplifié d'induction de la luminescence chez *Escherichia coli* TBT3

Notons que l'équipe de recherche en microbiologie à l'Université de Mc Gill au Canada (Professeur MS DuBow) a créé, depuis plus de 15 ans de recherche, une collection de 3000 clones bactériens (réactifs biologiques) dans lesquels a été introduit un gène rapporteur permettant l'émission de lumière en réponse à un stimulus précis. Parmi ces bactéries, certaines répondent spécifiquement à la présence d'une molécule (métal, molécule organique) ou à la variation de sa concentration en émettant plus ou moins de lumière même si la molécule est diluée dans un mélange complexe. A titre d'exemple, l'équipe de MS DuBow a obtenu des bactéries répondant par l'émission de lumière à l'Arsenic (As), le Chrome (Cr) et l'Aluminium (Al).

4. Emission spectrale des bactéries luminescentes

4.1. Problématique

Pour un biocapteur bactérien bioluminescent, le choix du transducteur optique dépend fortement du rayonnement lumineux reçu. En effet, il est nécessaire de savoir à quelle longueur d'onde les bactéries émettent de la lumière, si cette émission est continue et quels sont les paramètres pertinents qui sont susceptibles d'influencer cette émission.

Le choix des composants optoélectroniques nécessite donc une étude en amont basée sur la spectrométrie de la bioluminescence en fonction du type de bactéries (bactérie génétiquement

modifiée de type gram + ou gram -, naturellement luminescente). Cette étude permet aussi de savoir si la réaction de luminescence est identique pendant toutes les phases de croissance et en fonction du milieu de culture (riche ou pauvre).

4.2. Dispositif expérimental

Pour effectuer une mesure spectrométrique, les bactéries sont cultivées dans un bioréacteur en « batch » sans renouvellement du milieu de culture. Le volume utilisé est de 100 mL. Les bactéries sont cultivées dans des conditions de croissance optimales, à savoir une température constante (25 °C ou 30 °C selon le type de bactéries) et une agitation en continu pour assurer une bonne oxygénation dans tout le volume. La lumière émise est collectée par une lentille et guidée ensuite par un faisceau de fibres optiques vers le spectromètre.

La figure 1.4 donne un schéma du banc expérimental adopté[4].

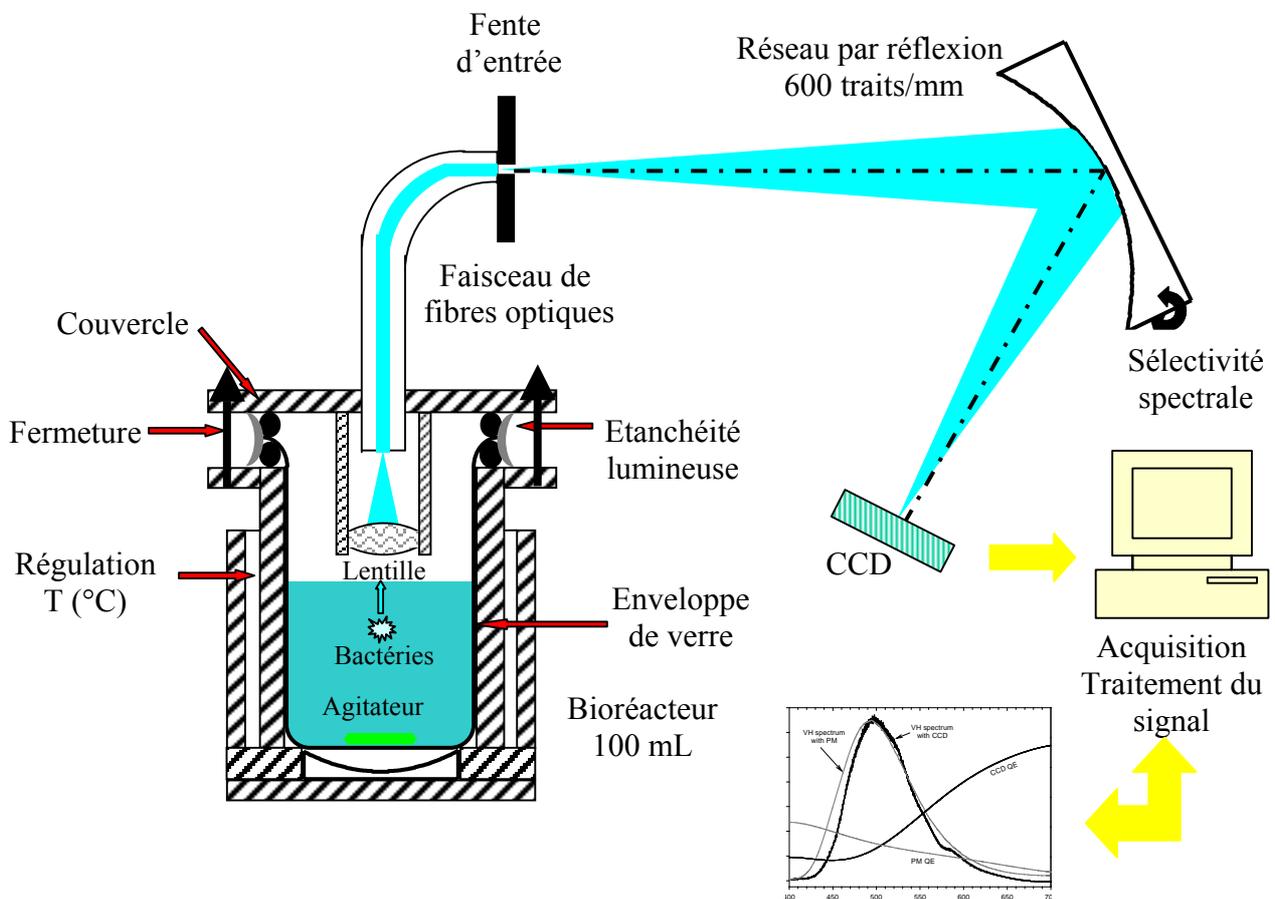


Figure 1.4 : Dispositif expérimental

La figure 1.5 présente une photographie du dispositif réalisé au laboratoire PEC.

Couplage par faisceau de fibres optiques du spectromètre au bioréacteur

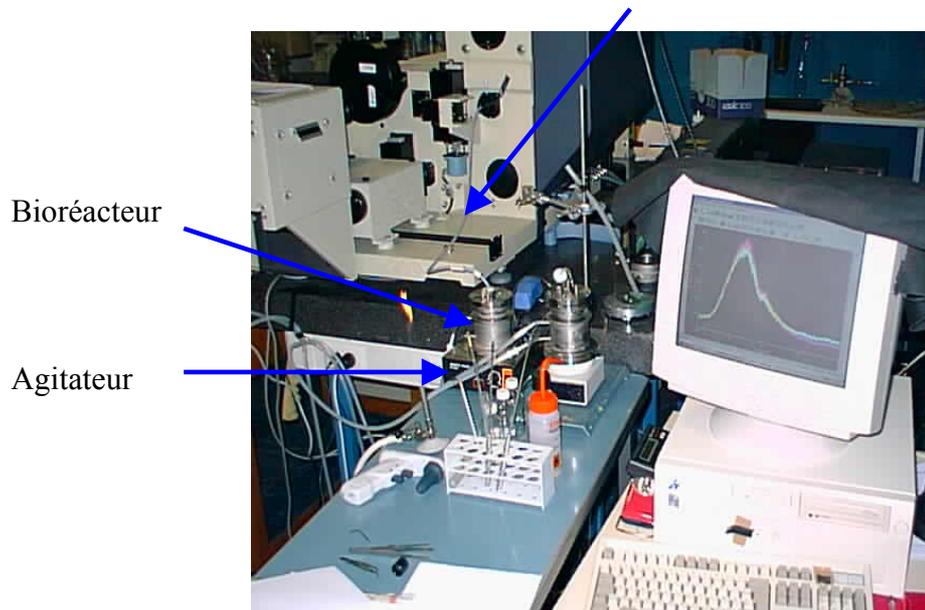


Figure 1.5 : Photographie du montage expérimental

Le spectromètre utilisé est un modèle Jobin-Yvon de type T64000 dont la fonction principale est l'étude de matériaux par spectroscopie Raman. Sa grande sensibilité aux faibles signaux lumineux nous a conduit à l'utiliser pour la mesure spectrale de la bioluminescence.

4.3. Résultats

Les spectres des figures 1.6, 1.7, 1.8 et 1.9 résument les résultats obtenus en prélude à cette thèse et publiés par l'équipe de recherche en 2003[4].

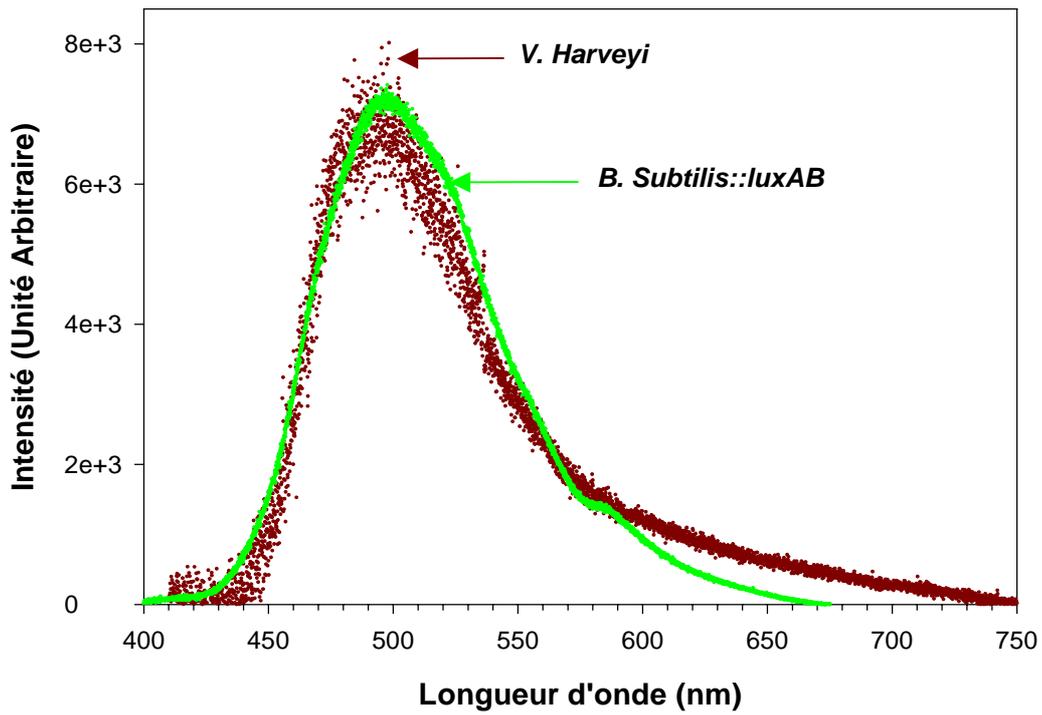


Figure 1.6 : Spectre d'émission d'une bactérie gram + (*Bacillus Subtilis*) en comparaison avec le spectre d'émission de *Vibrio Harveyi*

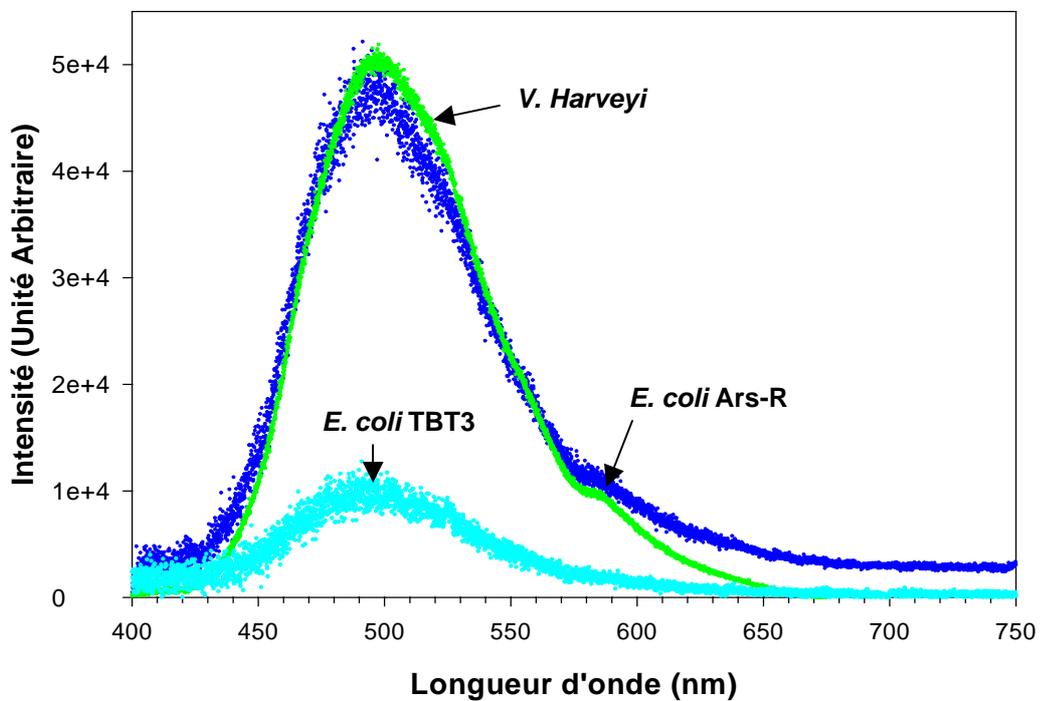


Figure 1.7 : Spectre d'émission des deux bactéries gram – (*E.Coli TBT3* et *E.Coli ArsR*) en comparaison avec le spectre d'émission de *Vibrio Harveyi*

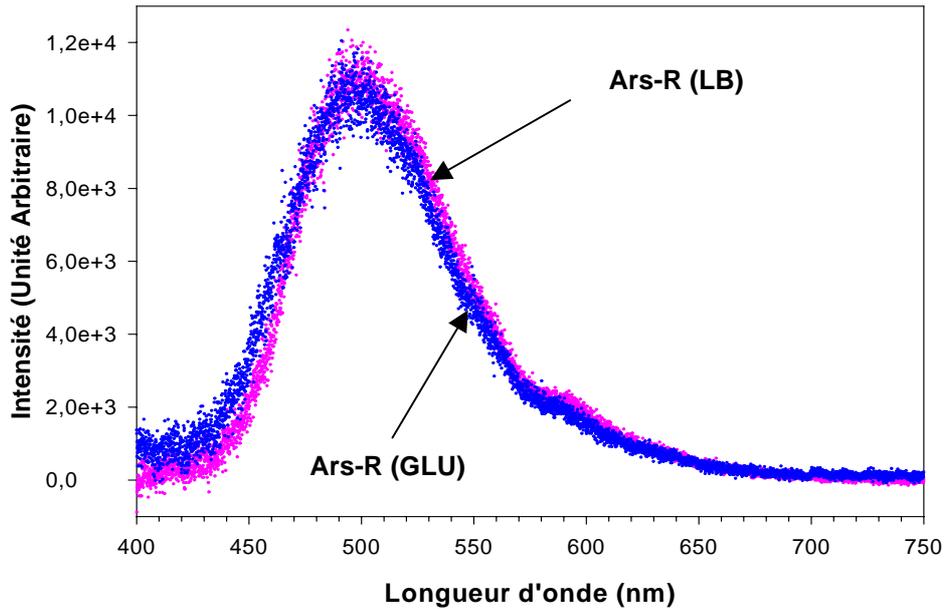


Figure 1.8 : Influence du milieu de culture sur le spectre d'émission de la bactérie *ArsR* (Milieu Luria Bertani(LB) et milieu glucose(GLU))

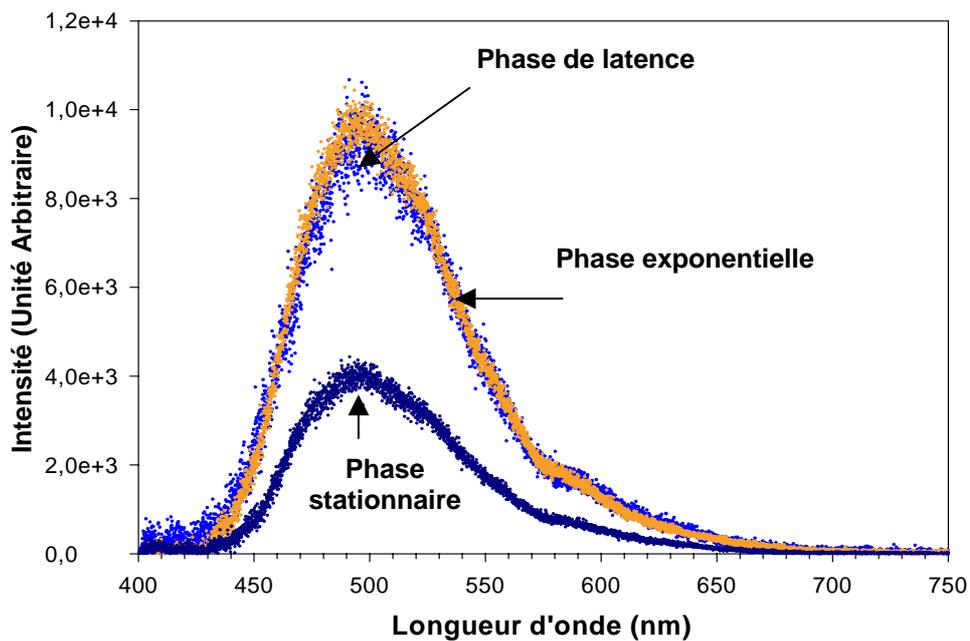


Figure 1.9 : Influence des trois phases de croissance sur le spectre d'émission de la bactérie *E. Coli ArsR*

4.4. Conclusion

D'après ces résultats expérimentaux, on constate qu'il n'y a pas de différence entre le spectre d'émission d'une bactérie naturellement luminescente, ce qui est le cas de *Vibrio Harveyi*, et celui d'une bactérie modifiée génétiquement. On note aussi que le type de bactérie (gram + ou

gram -), la phase de croissance et le milieu de culture n'ont pas d'influence notable sur le spectre d'émission.

Dans tous les spectres, on constate la présence de deux pics, le premier, majeur, proche de 498 nm et un second moins intense autour de 585 nm.

Cette étude préliminaire montre ainsi que le transducteur optique d'un biocapteur bactérien luminescent pourra être indépendant du type de bactéries utilisées et des conditions de croissance (milieu de culture et phase de croissance), à condition que les bactéries contiennent le gène *luxAB*.

Cette information de base est évidemment essentielle pour la conception de futurs biocapteurs, car elle permet de sélectionner efficacement le type de détecteur.

5. Applications de la bioluminescence

Les domaines d'application de la bioluminescence sont très variés. Nous ne citerons que quelques unes de ces applications :

5.1. Applications agro-alimentaires

Le domaine de l'agro-alimentaire est le domaine le plus important et le plus étudié actuellement. Il est maintenant possible d'évaluer la flore totale d'un lait cru, de l'eau minérale, de détecter la contamination d'un lait pasteurisé ou d'un jus de fruit.

Dans le lait par exemple, la bioluminescence a d'abord été utilisée pour détecter les cellules somatiques dont la présence est signe d'infection de la mamelle. Le diagnostic est facile en comptant les cellules somatiques; dans le lait, un niveau élevé indique la présence de leucocytes apportés par l'organisme pour combattre l'infection. La bioluminescence aide à détecter la concentration de bactéries dangereuses pour l'homme. Cette méthode de dosage a été aussi appliquée aux ovoproduits (blanc d'œuf, jaune d'œuf et œuf entier).

5.2. Applications dans le domaine médical et pharmaceutique

En médecine, la bioluminescence est également employée dans le diagnostic médical où il est parfois important de connaître rapidement le taux de contamination du liquide physiologique. De même, le dosage de l'ATP peut servir de témoin d'une activité physiologique. D'autres applications de la bioluminescence sont largement mises en œuvre en médecine telles que la détection de microorganismes dans l'urine, la détermination de la biomasse vivante dans les plaques dentaires et la viabilité des vaccins.

5.3. Applications dans le domaine de l'environnement

De nos jours, les applications dans le domaine de l'environnement sont diverses. Citons notamment, le traitement des eaux. En effet, la protection de l'environnement dépend, entre autre, du bon fonctionnement des stations d'épuration biologiques. Celles-ci sont chargées en boues, constituées d'une association complexe d'êtres vivants en perpétuelle évolution (biomasse). La productivité qualitative et quantitative des stations est directement liée à l'état physiologique de la biomasse. On cherche donc à contrôler l'activité de cette biomasse bactérienne dans la boue.

Dans le domaine de l'environnement, la bioluminescence est ainsi utilisée pour détecter la présence de polluants chimiques et pour contrôler les déchets.

Le tableau 1.1 ci-dessous résume les différentes applications de la bioluminescence.

Domaine d'application	Utilisations
Agro-alimentaire	Contrôle de stérilité des aliments, des emballages Suivi de l'hygiène Suivi de fermentations Contrôle de procédés...
Médical	Contrôle de stérilité de préparation injectable Contrôle de vaccins Contrôle de cellules cancéreuses Dermatologie...
Environnement	Traitement des eaux Evaluations de l'activité microbienne Tests de toxicité...
Autres	Contrôle de la dégradation des textiles par des agents microbiens Armes bactériologiques

Tableau 1.1 : Applications de la bioluminescence

III. Biocapteurs

1. Qu'est ce qu'un biocapteur?

Un biocapteur est défini comme étant un outil analytique associant un ou plusieurs éléments biologiques. Les biocapteurs les plus connus intègrent des organismes supérieurs (poissons, algues, verre de terre, ...) ou des microorganismes (bactéries essentiellement) et plus récemment, des enzymes et autres sondes moléculaires. Dans le cas des biocapteurs présentés dans cette thèse, l'élément biologique sera constitué de bactéries bioluminescentes. Ces éléments constituent le réactif biologique sensible. D'une façon générale, le signal émis est reçu par un transducteur dont la fonction est de convertir le signal biochimique (le contact entre l'analyte et le bioélément) en un signal facilement mesurable (signal thermique, électrique ou optique). Ce dernier est alors amplifié et transformé en un signal électrique.

Les transducteurs peuvent fonctionner selon plusieurs principes de mesures : l'ampérométrie, la potentiométrie, la conductimétrie, l'utilisation des charges ioniques (avec les membranes sélectives) et des transistors à effet de champ[5,6,7]. Les transducteurs optiques peuvent utiliser des mesures de fluorescence, de chimiluminescence, de colorimétrie, d'absorption de

la lumière[7]. La transduction peut aussi être calorimétrique car les réactions enzymatiques ou celles catalysées par un micro-organisme peuvent générer une chaleur de 20 à 100 kJ/mol. Quant aux transducteurs massiques, ils utilisent des microbalances à quartz dont la fréquence dépend de la masse déposée[8].

Les biocapteurs apparaissent comme une bonne alternative pour détecter des substances chimiques, tels que les polluants organiques (pesticides par exemple), les métaux ou les sels nutritifs (nitrates), ou des matériaux biologiques (algues toxiques). En effet, ils peuvent être sélectifs, sensibles et permettent d'obtenir des mesures rapides in situ.

Un biocapteur est généralement conçu pour produire un signal proportionnel à la concentration de la substance à détecter. La figure 1.10 représente un schéma du principe de construction d'un biocapteur.

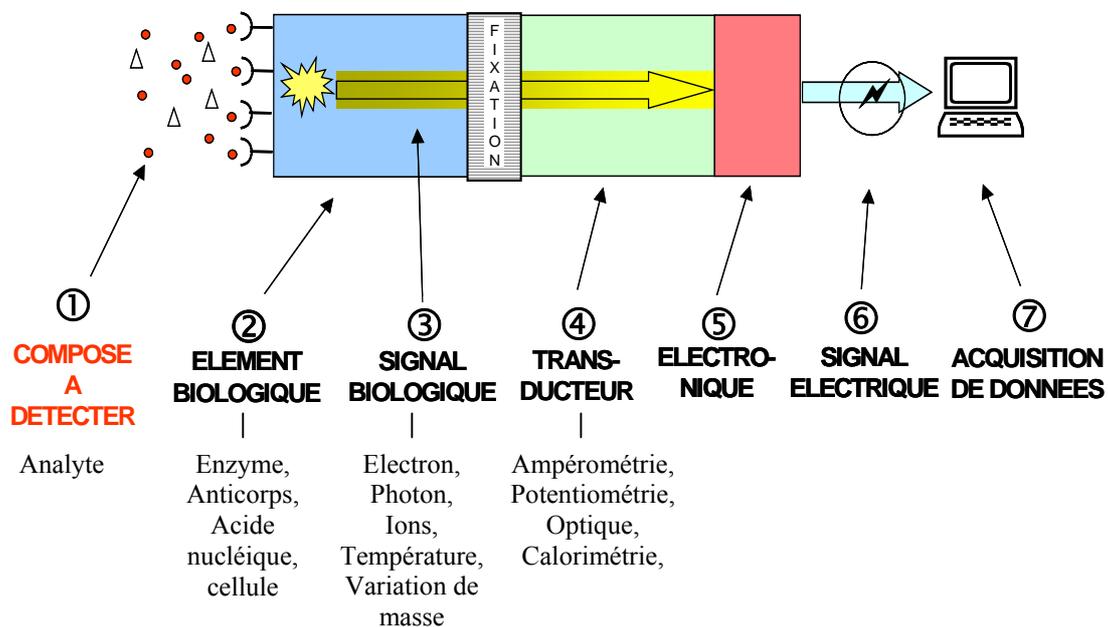


Figure 1.10 : Schéma général de fonctionnement d'un biocapteur

2. Types de biocapteurs

Il existe plusieurs types de biocapteurs, à titre d'exemple nous recensons :

- **Biocapteurs pour détecter les polluants organiques**

Parmi les polluants organiques, il est possible de détecter les hydrocarbures polycycliques aromatiques (HAP). La dégradation microbienne des hydrocarbures permet de concevoir des biocapteurs à partir de cellules bactériennes ou d'enzymes. Des concentrations de l'ordre du μM ont été détectées[9]. Le couplage de bactéries avec une mesure de luminescence[10] ou d'électrochimie[11] a permis de détecter du benzène mais l'inconvénient de ces biocapteurs est leur faible sélectivité. Ils réagissent avec d'autres polluants, et mesurent une toxicité globale. En revanche, l'utilisation de bactéries recombinantes avec des promoteurs contrôlant la synthèse d'enzymes dégradant des molécules organiques est plus sélective. Des biocapteurs

basés sur ce principe ont permis de détecter de très faibles concentrations de naphthalène (0,5 μM)[12,13,14].

- **Biocapteurs pour détecter les métaux**

Généralement, les biocapteurs utilisés pour détecter la présence de métaux sont constitués d'enzymes couplés à une mesure de luminescence[15,16,17]. Ces biocapteurs manquent de sélectivité et ont tendance à donner une mesure de toxicité globale. D'autres biocapteurs, notamment pour détecter le mercure (Hg) ou le cadmium (Cd), assurent une meilleure sélectivité[18,19,20]. Pour le Cd, un biocapteur a été développé à partir du gène LacZ couplé à un transducteur enzymatique électrochimique[20]. Il permet de détecter 25 à 1000 nM de Cd^{2+} .

3. Biocapteurs bactériens luminescents

3.1. Intérêt

L'utilisation des bactéries comme réactif biologique présente deux intérêts majeurs :

- **Ecologique**

Les bactéries sont présentes dans tous les écosystèmes et interviennent dans tous les cycles géochimiques (carbone, azote,...). Un dysfonctionnement à leur niveau signifie un arrêt de tous les cycles géochimiques. La connaissance de leur état physiologique est donc primordiale. Les microorganismes répondent la plupart du temps à un stress (chimique par exemple) en modifiant leur physiologie. Cette réponse est souvent génétique.

- **Economique**

Les bactéries se multiplient par million en quelques heures sur des milieux très bon marché. Cette propriété est indispensable pour concevoir un biocapteur faible coût; ce qui n'est pas le cas des systèmes qui utilisent des enzymes ou des anticorps comme réactif biologique. En effet, ils nécessitent des étapes d'extraction lourdes et coûteuses.

3.2. Pourquoi utiliser des bactéries luminescentes ?

L'utilisation des bactéries luminescentes présente des avantages considérables par rapport aux systèmes utilisant des réactifs biologiques classiques :

- La réponse (émission de lumière) est proportionnelle à la concentration de la molécule recherchée.
- Contrairement à la plupart des biocapteurs, ces biocapteurs mesurent des concentrations de substances biodisponibles à l'organisme. Cette propriété les distingue des mesures effectuées par dosages chimiques ou biochimiques. Ces derniers déterminent une concentration totale en polluant qui n'est pas forcément celle que voient les bactéries. Pourtant, c'est la biodisponibilité qui détermine la toxicité d'une substance.

- La sensibilité du système est supérieure à celle des méthodes classiques de dosage.
- La détection est très simple, rapide, et le coût est ajustable selon les besoins.

3.3. Substances cibles

Le biocapteur bactérien luminescent doit détecter des substances diverses telles que des molécules organiques, inorganiques ou organométalliques et/ou des microorganismes :

- **Molécules organiques**

Parmi les exemples, nous pouvons citer les pesticides qui posent un problème réel de santé publique mais aussi les hydrocarbures. Ceux-ci sont impliqués directement dans des problèmes environnementaux mais leur accumulation, dans les poissons par exemple, poussent le problème vers le consommateur et intéresseraient de ce fait les partenaires de l'agro-alimentaire et de la santé. Les toxines, produites par des algues ou des bactéries, touchent aussi des problèmes d'environnement, de santé publique et agro-alimentaires.

- **Molécules inorganiques**

Les substances concernées sont principalement le Chrome (Cr), le Nickel (Ni), le Cadmium (Cd) et le Mercure (Hg). En France, l'Aluminium (Al) semble poser des problèmes neurologiques, notamment chez les mammifères (maladie d'Alzheimer).

Parmi les molécules organométalliques, on trouve également le tributyl-étain (TBT), un biocide couramment utilisé pour la conservation du bois, la désinfection des circuits de refroidissement, pour contrôler la viscosité du papier, comme agent stabilisant des plastiques et comme agent antisalissure incorporé dans les peintures appliquées sur les coques de navires. Le TBT pose un sérieux problème de santé publique (dommages hépatiques, troubles du comportement). Ce composé représente également un danger pour l'économie des régions maritimes. Bien que ce biocide soit désormais interdit, il est retrouvé dans différents compartiments marins et d'eau douce, en particulier dans les sédiments (le TBT est très peu soluble dans l'eau). La détection de ce composé est importante sur trois plans :

- Sanitaire et santé publique;
- Economie régionale;
- Gestion des espaces maritimes.

Le projet de recherche a centré son action sur cette cible, pour l'intérêt évident que lui portent les industriels et collectivités locales de Vendée.

- **Microorganismes**

Les microorganismes peuvent causer des infections d'origine alimentaire pouvant entraîner des conséquences dramatiques. Parmi les microorganismes pathogènes, on trouve *Escherichia coli* et *Salmonella* qui causent des gastro-entérites chez les nouveaux nés et les personnes immunodéprimées. *Listeria*, se rencontre dans le fourrage ensilé où elle trouve des conditions

de multiplication idéales. La mauvaise qualité de l'ensilage entraîne la contamination du bétail et la transmission à l'homme s'effectue par voie vétérinaire ou alimentaire.

3.4. Caractéristiques cibles

Les caractéristiques des biocapteurs que nous souhaitons développer sont les suivantes :

- **Sensibilité** : pour la mesure de micropolluants, il est souhaitable d'avoir un biocapteur mesurant de très faible concentration de l'ordre de quelques $\mu\text{g/L}$.
- **Rapidité** : la mesure doit être rapide, quelques heures au maximum (<12 heures).
- **Taille, autonomie et coût** : le souhait actuel est de posséder un appareil de petite taille, autonome et d'un coût réduit. Cependant ces trois paramètres sont discutables, ils sont fonction de l'élément à détecter et fonction du type de mesure souhaitée.
- **Simplicité et sécurité** : le biocapteur doit être simple à utiliser et doit être totalement sécurisé d'un point de vue relarguage éventuel de microorganismes. Il faut un système de destruction des réactifs biologiques une fois les analyses effectuées.

IV. Objectifs de la thèse

Dans le but de détecter des polluants dans le secteur de l'environnement et des bactéries dans le secteur de l'agro-alimentaire, nous nous sommes intéressés, dans le cadre de cette thèse, à la conception, la mise au point et la caractérisation de biocapteurs bactériens luminescents. Ce travail est effectué en étroite collaboration avec le laboratoire CBAC (Capteurs Bactériens pour l'Analyse et le Contrôle) de l'IUT de la Roche/Yon qui est maître d'œuvre dans la définition du cahier des charges.

1. Biocapteur Lumisens I

C'est un biocapteur monocanal en phase liquide développé pour la détection de tributyl-étain (TBT) par utilisation de la souche *Escherichia coli* TBT3 spécifique du TBT. Son originalité est la mesure simultanée et en ligne de la bioluminescence et de la densité cellulaire. Ce biocapteur sera présenté dans le Chapitre II.

2. Biocapteur Lumisens II

C'est un biocapteur multicanal en phase immobilisée. Ce dispositif permet la détection de plusieurs polluants simultanément par mesure de bioluminescence. Il sera discuté dans le Chapitre III.

3. Caractérisation des bactéries par spectroscopie Raman

En parallèle avec le développement de ces deux biocapteurs, nous nous sommes intéressés à la caractérisation physico-chimique des bactéries par diffusion Raman. Cette caractérisation permet de comprendre comment évolue l'état physiologique des bactéries en fonction de leur

age. Pour des bactéries immobilisée dans une membrane, ce qui est le cas du biocapteur Lumisens II, cette étude spectroscopique pourrait permettre de suivre l'évolution de son état physiologique en fonction du temps.

Nous avons par ailleurs appliqué la technique spectroscopique pour analyser la présence de traces de TBT dans des peintures et ainsi comparer cette technique d'analyse aux résultats donnés par le biocapteur.



V. Références

1. S. Ulitzur, Established technologies and new approaches in applying luminous bacteria for analytical purposes, *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence*, **12** (1997) 179-192.
2. E.A. Meighen, Genetics of bacterial bioluminescence, *Annual Review of Genetic*, **2** (1994) 117-139.
3. A. Gzzo, M.S. DuBow, Construction of a stable, single copy luciferase gene fusions in Escherichia Coli, *Archiv in Microbiology*, **156** (1991) 444-448.
4. G. Thouand, Ph. Daniel, H. Horry, P. Picart, M.J. Durand, K. Killham, O.G.G. Knox, M.S. Dubow, M. Rousseau, Comparison of the spectral emission of lux recombinant and bioluminescent marine bacteria, *Luminescence*, **18** (2003) 145-155.
5. P. Bergveld, Thirty years of ISFETLOGY : What happened in the past 30 years and what may happen in the next 30 years, *Sensors and Actuators B*, **88** (2003) 1-20.
6. U. Bilitewski, Technical principles, In Bilitewski U. & Turner A.P.F., *Biosensors for Environmental Monitoring*, Harwood Academic Publishers, Amsterdam, (2000) 5-28.
7. L.D. Mello, L.T. Kubota, Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries, *Food Chemistry*, **77** (2002) 237-256.
8. C. K. O'Sullivan, R. Vaughan, G.G. Guilbault, Piezo-electric immunosensors-theory and application, *Analytical Letters*, **32** (1999) 2353-2377.
9. J.D. Fourneron, S.Tjollyn, L. Rocher, E. Quelven, Approche d'un dosage immunoenzymatique des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), *Lett. Sci. Chim.*, **62** (1997) 36-39.
10. E. Boyd, A. Meharg, J. Wright, K. Killham, Assessment of toxicological interactions of benzene and its primary degradation products using lux-modified bacterial bioassay, *Environmental Science & Technology*, **31** (1997) 1505-1511.
11. M. Farre, O. Pasini, C. Alonso, M. Castillo, D. Barcelo, Toxicity assessment of organic pollution in wastewaters using a bacterial biosensor, *Analytica Chimica Acta*, **426** (2001) 155-165.
12. R. Burlage, G. Sayler, F. Larimer, Monitoring of naphthalene catabolism by bioluminescence with nah-lux transcriptional fusions, *Journal of Bacteriology*, **172** (1990) 4749-4757.
13. J. King, P. Digrazia, B. Applegate, R. Burlage, J. Sanseverino, J. Dunbar, F. Larimer, G. Sayler, Rapid, sensitive bioluminescent reporter technology for naphthalene exposure and biodegradation, *Science*, **249** (1990) 778-781.



14. A. Heitzer, K. Malachowsky, J. Thonnard, P. Bienkowski, D. White, G. Saylor, Optical biosensor for environmental on line monitoring of naphthalene and salicylate bioavailability with an immobilized bioluminescent catabolic reporter bacterium, *Applied & Environmental Microbiology*, **60** (1994) 1487-1494.
15. J. Bruno, S. Collard, D. Kuch, J. Cornette, Novel biological sources of electrochemiluminescence and potential applications to metals detection, *SPIE Proceedings series 1996, Advanced Technologies for Environmental Monitoring and Remediation*, **2835** (1996) 161-166.
16. S. Tauriainen, M. Virta, M. Karp, Detecting bioavailable toxic metals and metalloids from natural water samples using luminescent sensor bacteria, *Water Research*, **34** (2000) 2661-2666.
17. V. Donckt, Trace metal monitoring in surface marine waters and estuaries (Cd, Zn, Hg, Pb, Cu, Fe, Mn and Co), *Third European Marine Science & Technology Conference, Lisbon*, **IV** (1998) 1548-1552.
18. O. Selifonova, R. Burlage, T. Barkay, Bioluminescence sensors for detection of bioavailable Hg in the environment, *Applied & Environmental Microbiology*, **59** (1993) 3083-3090.
19. T. Barkay, R. Turner, L. Rasmussen, C. Kelly, J. Rudd, Luminescence facilitated detection of bioavailable mercury in natural waters, *Methods in Molecular Biology, Bioluminescence Methods & Protocols*, **102** (1998) 231-245.
20. I. Biran, R. Babai, K. Levkov, J. Rishpon, E. Ron, Online and in situ monitoring of environmental pollutants : electrochemical biosensing of cadmium, *Environmental Microbiology*, **2** (2000) 285-290.





Chapitre II

Biocapteur bactérien luminescent

Lumisens I





I. Introduction

Comme nous l'avons décrit au Chapitre I, la quantification des microorganismes joue un rôle très important dans différents domaines en particulier en médecine, environnement, industrie et agro-alimentaire. Actuellement, il existe deux méthodes de contrôle et de surveillance :

Les méthodes directes donnent directement une estimation sur la quantité de biomasse durant tout le processus de fabrication.

Les méthodes indirectes basées sur l'utilisation des caractéristiques des microorganismes par analyse des propriétés électrochimiques, biochimiques, physiques ou encore optiques. A titre d'exemple, on peut mesurer la luminescence, l'impédance, ou des composantes de la cellule tel que l'ATP, les protéines, les lipides et les acides nucléiques[1,2,3,4,5]. Ce type de méthodes indirectes est rapide, fiable et largement utilisé.

Plusieurs auteurs s'intéressent à la détection d'ATP par bioluminescence[1] (l'Adénosine TriPhosphate est une molécule qui se trouve dans toutes les cellules vivantes, et sert à la production d'énergie nécessaire au fonctionnement de la cellule). En présence des molécules d'ATP, il se produit des radiations lumineuses; la quantité d'ATP est proportionnelle au flux lumineux émis par les bactéries. Pour la mesure d'ATP, deux instruments ont été développés (Lumac Biocounter et Unilite)[1] afin d'estimer la quantité de biomasse. Par application du principe de bioluminescence, ils permettent de mesurer de très faibles niveaux d'ATP (4 nmol.mg^{-1}) dans un court temps (10 min). Ces deux méthodes ont des inconvénients concernant l'identification de l'ATP utile provenant des bactéries de celle non bactériale ce qui nécessite un pré-traitement donc un temps plus long.

D'autres systèmes développés pour le comptage des microorganismes tel que « Coulter counter »[1] commercialisé par Coulter Electronics au Canada et « RAMUS 265 »[1] développé par Orbec Ltd donnent directement le nombre de particules et leurs tailles dans un court temps. Toutefois leur inconvénient reste la non différenciation entre les cellules viables et non viables. Il existe d'autres méthodes pour la détection de biomasse. Parmi celles-ci, on trouve les membranes piézoélectriques, ARD (Acoustic resonance densitometry)[1]. Toutes ces méthodes sont rapides, fiables mais l'inconvénient reste toujours la non-distinction entre les cellules utiles des autres cellules.

La mesure d'ATP par bioluminescence est appliquée dans d'autres cas. Ainsi, elle est utilisée comme une méthode de surveillance d'hygiène par une équipe au Canada[3]; en effet, la technique est basée sur un mélange entre le prélèvement effectué d'une partie de la surface à analyser et de la luciférase. Pour la mesure de la lumière émise un luminomètre est utilisé. Le flux mesuré donne une indication sur l'état de propreté de la surface. Cette technique de mesure est utilisable pour la laiterie et les services alimentaires par exemple.

En plus de cette technique de mesure d'ATP, d'autres méthodes sont utilisées pour le contrôle et le suivi de croissance des bactéries. On trouve une technique basée sur la mesure de la permittivité de la culture bactérienne[6], par utilisation d'un circuit LC et d'une antenne. Le contrôle est effectué par mesure de spectre d'impédance avec un analyseur d'impédance. Le capteur LC est plongé dans le milieu de culture et mis à une distance de 8 cm de l'antenne. Cette technique est limitée car la distance entre l'antenne et le capteur est fonction des dimensions du capteur et du diamètre de l'antenne. Plus elle sera grande, plus grand sera le diamètre de l'antenne.

La bioluminescence est utilisée dans différents domaines pour le suivi de croissance bactérienne et pour la mesure de toxicité dans l'environnement[7]. A cet effet, il existe plusieurs instruments pour mesurer la bioluminescence, on trouve les luminomètres à microplaques[8], les photomultiplicateurs à comptage de photons ou analogique[9], l'imagerie photographique par utilisation de films sensibles[8,10] mais avec une dynamique limitée, des caméras CCD refroidies ou intensifiées, des photodiodes[7] et des méthodes spectroscopiques[11,12,13].

Dans le domaine de l'environnement, quelques systèmes de surveillance sont développés pour le contrôle de pollution. En 1996, l'équipe de M.B. Gu[14] a développé un bioréacteur d'un volume de 58 mL pour une culture en continu et pour la détection des toxiques en utilisant la bactérie bioluminescente *Escherichia coli* TV1061 sensible à la présence d'éthanol. Ce bioréacteur est muni de sondes pour contrôler le pH, la température et l'oxygène. La détection de la bioluminescence est assurée par un faisceau de fibre optique et un luminomètre. Pour le suivi de la densité optique, un spectrophotomètre est utilisé. En 1999, ils ont développé un système utilisant deux mini réacteurs en série[15], le premier pour la culture en continu de la souche bactérienne (un volume de 10 ml) et le second pour l'ajout du toxique et la mesure de bioluminescence (volume de 20 ml). Au niveau du système de détection, un faisceau de fibres optiques est connecté d'une part au second réacteur et d'autre part au luminomètre. Ce système a pour avantage d'utiliser un faible volume de mesure dans le but de minimiser la consommation du milieu de culture et travailler longtemps avec le milieu.

Les différents systèmes développés, bien qu'ils soient fiables pour une mesure en continu de la bioluminescence en phase liquide, ne permettent pas une évaluation en continu d'autres paramètres tel que la densité optique. En effet, la bioluminescence est liée à la densité optique; elle diminue lorsque la densité optique diminue ou lorsqu'un toxique est présent dans la culture. Il est donc primordial d'avoir un système à double mesure, mesurant en simultané la bioluminescence et la densité optique. Nous nous sommes fixés cet objectif et ce chapitre présente donc un nouveau bioréacteur opto-électronique en phase liquide. Ce biocapteur a été baptisé Lumisens I. Typiquement la gamme de densité optique mesurable devra être comprise entre 0 et 1.

L'objectif de ce dispositif est de fournir au secteur de l'environnement un biocapteur permettant la détection de polluants organiques ou métalliques tel que le tributyl-étain (TBT). Le biocapteur doit être simple à utiliser, rapide, fiable et peu coûteux. Il permettra de faire des mesures in situ, en continu des radiations lumineuses émises par les bactéries dans un milieu liquide simultanément avec le suivi de la croissance bactérienne par estimation en continu de la densité cellulaire via la densité optique.

Nous présenterons tout d'abord le principe de mesure de la bioluminescence et de la densité optique, puis nous présenterons le système que nous avons mis au point. Dans la dernière partie, nous discuterons les résultats obtenus lors de la validation du biocapteur via une comparaison entre les mesures dites automatiques obtenues par le biocapteur et les mesures manuelles par prélèvement, obtenues par un spectrophotomètre commercial pour la mesure de la densité optique et par le luminomètre à microplaques pour la mesure de bioluminescence. Nous présenterons également les résultats obtenus pour la détection d'organo-étains et en particulier le tributyl-étain (TBT) par utilisation de la bactérie génétiquement modifiée *Escherichia Coli* TBT3 sensible à la présence de TBT.



II. Principe de mesure

1. Densité optique

1.1. Définition

Un rayon lumineux traverse une solution contenue dans une cuve transparente. En traversant la cuve, l'intensité lumineuse diminue en étant partiellement absorbée par la solution. Ensuite le faisceau est détecté et on mesure l'intensité transmise I . Cette intensité mesurée est classiquement liée à l'intensité initiale I_0 par la loi de Beer-Lambert :

$$I = I_0 e^{-\varepsilon c l} \quad (2.1)$$

Avec

- c : concentration (en mol/l);
- l : trajet optique (en cm);
- ε : coefficient d'extinction molaire (en l/mol/cm).

Le produit $\varepsilon \times c$ est homogène à une atténuation linéique notée α .

La densité optique (DO) est donnée directement par un spectrophotomètre commercial. Elle est liée au rapport d'intensité du rayon transmis au rayon initial. Nous avons ainsi la relation :

$$DO = -\log_{10} \frac{I}{I_0} \quad (2.2)$$

La figure 2.1 ci-dessous donne le principe de mesure de la densité optique par le spectrophotomètre du commerce.

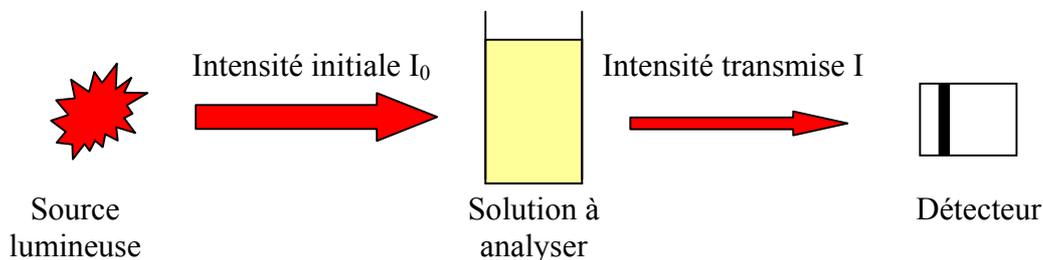


Figure 2.1 : Principe du spectrophotomètre du commerce pour la mesure de densité optique

1.2. Principe de mesure de la densité optique par Lumisens I

La figure suivante représente un schéma simplifié du principe de mesure que nous avons retenu pour Lumisens I :

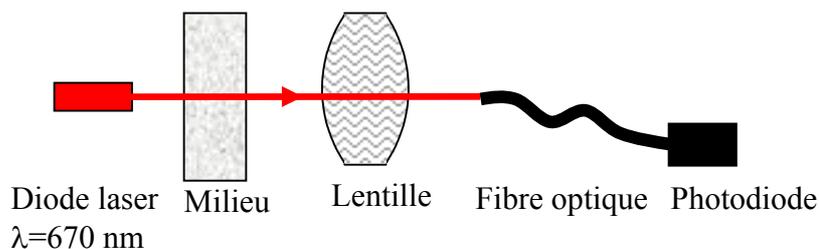


Figure 2.2 : Principe de mesure de la densité optique par biocapteur

Pour se rapprocher des conditions usuelles d'expérimentation des biologistes, nous avons utilisé un signal sonde émis par une diode laser avec une puissance de 1 mW et avec une longueur d'onde d'émission $\lambda = 670$ nm. Le faisceau laser traverse le milieu, son intensité est atténuée en fonction de la concentration cellulaire des bactéries dans le milieu de culture. Le signal est collecté par une lentille et guidé par une des voies du faisceau de fibres optiques.

Considérons P_0 la puissance du laser transmise en absence des bactéries dans le milieu. P_0 est une valeur de référence. Soit P_t la puissance du laser transmise en présence des bactéries dans le milieu.

L'expression de la densité optique sera donnée par la relation suivante selon la loi de Beer-Lambert :

$$DO = -\log_{10}\left(\frac{P_t}{P_0}\right) = \frac{1}{\ln 10} \alpha l \quad (2.3)$$

où α représente l'atténuation linéique du milieu. Ce paramètre est fonction de la concentration cellulaire et des phénomènes d'absorption et de diffusion existant dans le milieu pour une épaisseur donnée du liquide (l). La densité optique est donc proportionnelle à la concentration cellulaire.

Dans le cas de Lumisens I, la hauteur du liquide dans le réacteur sera de 34,5 mm. Avec le spectrophotomètre du commerce, méthode habituellement utilisée pour mesurer la densité optique, l'épaisseur du liquide traversé par le faisceau de lumière est de 10 mm.

Etant donné que l'atténuation linéique est une caractéristique du milieu, notre estimation sur l'expression de la densité optique sera donc :

$$\hat{DO} = \frac{z_s}{z_b} [\log_{10}(P_t) - \log_{10}(P_0)] \quad (2.4)$$

Avec :

z_s : épaisseur du milieu traversé par le faisceau de lumière dans la cuve de spectrophotomètre du commerce ($z_s = 10$ mm);

z_b : épaisseur du milieu traversé par le faisceau laser dans le réacteur ($z_b = 34,5$ mm).

Cette expression nous donne une comparaison entre la mesure de la densité optique donnée par le biocapteur Lumisens I et celle donnée par le spectrophotomètre du commerce.

La mise en oeuvre de l'équation (2.4) impose une mesure absolue de l'intensité de référence P_0 et du signal utile P_t . Afin de mesurer ces intensités, nous avons développé une détection synchrone numérique basée sur une modulation optoélectronique de la puissance du laser et une mesure numérique de l'amplitude du spectre de puissance à la fréquence fondamentale.

La fréquence de modulation f_0 , la fréquence d'échantillonnage f_e et le nombre total de points acquis N doivent vérifier la relation suivante :

$$N \frac{f_0}{f_e} = n_0, \quad n_0 \in N^* \quad (2.5)$$

Le signal de référence noté $S_0(t)$ est un signal périodique qu'on peut l'écrire en une somme d'harmoniques[16]:

$$s_0(t) = a_0 + \sum_{k=1}^{\infty} c_k \sin(2\pi k f_0 t + \varphi_k) \quad (2.6)$$

Où a_0 représente la composante continue du signal, c_k est l'amplitude de l'harmonique d'ordre k et φ_k est sa phase.

Suivant la forme du signal modulé donné par la diode laser, nous avons calculé numériquement la valeur de l'offset et la valeur d'harmonique fondamental (pour $k = 1$).

Nous avons $a_0 \cong P_0/2,75$ et $c_1 \cong P_0/2,1$ avec P_0 étant la puissance initiale du laser (1 mW).

La densité spectrale du signal, correspond à la transformée de Fourier du signal temporel (TF), est donnée par :

$$\tilde{s}_0(\nu) = |TF[s_0(t)](\nu)|^2 \quad (2.7)$$

Après filtrage et numérisation à la fréquence f_e avec N points, la densité spectrale du signal détecté est estimée en utilisant un algorithme de transformée de Fourier rapide (FFT) pour N points. Elle s'écrit sous la forme :

$$\tilde{s}_0(n) \cong a_0^2 \delta(n) + \frac{1}{N^2} \sum_{k=1}^{k < f_e/2f_0} c_k^2 \tilde{W}^2(n/N - k f_0/f_e) \quad (2.8)$$

Avec :

- $\delta(n)$: fonction de Dirac;
- $\tilde{W}(n) = \sin(\pi N n)/\sin(\pi n)$: fonction de filtrage de la FFT;
- n : varie de 0 à $\frac{N}{2}-1$.

Si la condition de synchronisation établie par l'équation (2.5) est vérifiée, la relation (2.8) devient :

$$\tilde{s}_0(n) \cong a_0^2 \delta(n) + \sum_{k=1}^{k < f_e/2f_0} c_k^2 \delta(n - k n_0) \quad (2.9)$$

Lorsque la densité cellulaire augmente dans le milieu, l'intensité du signal traversant le milieu décroît exponentiellement selon l'expression :

$$S_t(t) = \exp(-\alpha z_b) S_0(t) \quad (2.10)$$

et la densité spectrale devient :

$$\tilde{s}_t(n) \cong (a_0 \exp(-\alpha z_b))^2 \delta(n) + \sum_{k=1}^{k < f_e/2f_0} (c_k \exp(-\alpha z_b))^2 \delta(n - k n_0) \quad (2.11)$$

Si on considère qu'à la fréquence fondamentale f_0 , $\hat{C}_0^1 = c_1^2$ est la composante du signal de référence et $\hat{C}_t^1 = c_1^2 \exp(-2\alpha z_b)$, la composante du signal utile à la même fréquence, l'expression finale de la densité optique sera :

$$\hat{DO} = \frac{1}{2} \frac{z_s}{z_b} \left[\log_{10}(\hat{C}_t^1) - \log_{10}(\hat{C}_0^1) \right] \quad (2.12)$$

Les coefficients \hat{C}_0^1 et \hat{C}_t^1 sont calculés en utilisant le spectre de puissance à la fréquence fondamentale f_0 par la relation :

$$\hat{C}_{0,t}^1 = \tilde{s}_{0,t}(n_0) \quad (2.13)$$

Pratiquement, nous avons travaillé avec les valeurs suivantes :

$$\begin{aligned} f_0 &= 244,8 \text{ Hz;} \\ f_e &= 4915,2 \text{ Hz;} \\ N &= 2048; \\ \text{d'ou } n_0 &= 102. \end{aligned}$$

1.3. Rapport signal sur bruit

1.3.1. Introduction

Un bruit correspond a un signal parasite aléatoire, de valeur moyenne temporelle nulle, touchant identiquement toutes les fréquences (bruit blanc), ou bien de valeur moyenne non nulle car corrélé à une variable extérieure ou intérieure au système (la température par exemple).

Une détection idéale sera celle où le niveau de ce bruit (la plupart du temps composé de plusieurs contributions de sources différentes) sera bien inférieur à celui du signal. Ceci nous ramène à définir le rapport signal sur bruit (RSB), qui permet de quantifier la qualité d'une détection. On considère souvent qu'un élément de signal est détecté si $RSB \geq 1$, mais alors aucune information n'en est pratiquement retirable. Pour obtenir un signal mesurable et significatif, il faut avoir $RSB \geq 2$.

Il est donc important d'identifier les différentes origines de bruit afin d'estimer les performances de la détection synchrone numérique.

1.3.2. Types de bruits

En général, il existe cinq types de bruit :

- **Bruit thermique** : dans tout conducteur, l'agitation thermique des électrons et des trous entraîne des fluctuations de leur densité autour de leur valeur moyenne ; il en résulte de petites, continues et aléatoires variations de la tension aux bornes du conducteur. Le bruit thermique est associé à tout composant résistif.

La densité spectrale S_{Vb} du bruit thermique dans une résistance est donnée par la formule de Johnson :

$$S_{Vb} = 4kTR \quad (V^2.Hz^{-1}) \quad (2.14)$$

Avec :

- k : constante de Boltzmann;
- T : température absolue;
- R : valeur de la résistance;

Cette densité spectrale «blanche» est indépendante de la fréquence.

- **Bruit de Schottky** : (bruit de grenaille) ce bruit correspond aux fluctuations d'un courant I dues au passage d'une barrière de potentiel (jonction entre des semi-conducteurs p et n par exemple).

Le bruit de grenaille s'exprime au moyen d'un courant de bruit dont la densité spectrale S_{Ib} est donnée par la formule de Schottky :

$$S_{Ib} = 2q(I_{obs} + I_{\mu}) \quad (A^2.Hz^{-1}) \quad (2.15)$$

avec :

- q : charge de l'électron;
- I_{obs} : courant d'obscurité;
- I_{μ} : courant photoélectrique dû au flux moyen reçu;

Le bruit de Schottky est un bruit blanc.

- **Bruit en $1/f$** : il est inversement proportionnel à la fréquence, ce type de bruit n'est important qu'aux fréquences basses. Ce bruit est dû aux fluctuations des densités de porteurs qui ont pour origine des recombinaisons dans les défauts de surface des matériaux semi-conducteurs. Il se traduit par des fluctuations de courant et de tension dont les densités spectrales $S_{Ib}(f)$ et $S_{Vb}(f)$ ont respectivement pour expressions :

$$S_{Ib}(f) = K_i I^2 / f \quad (2.16)$$

$$S_{Vb}(f) = (R_d)^2 K_i I^2 / f \quad (2.17)$$

avec :

- K_i : constante pour un dispositif déterminé;
- f : la fréquence
- I : le courant
- R_d : la résistance dynamique

- **Bruit de recombinaison-génération** : c'est un bruit basse fréquence associé au bruit en $1/f$ et également provoqué par la présence de défauts dans un matériau se comportant en pièges pour les porteurs et agissant comme des centres de génération-recombinaison.
- **Bruit de quantification** : c'est un bruit blanc, uniformément réparti (c'est-à-dire que les valeurs du bruit prennent de façon équiprobable toutes les valeurs comprises entre $-q/2$ et $q/2$, où q représente le pas de quantification). Ce type de bruit se trouve généralement dans les convertisseurs analogiques numériques (CAN). La puissance du bruit généré est proportionnelle au carré du pas de quantification :

$$e_b^2 = q^2/12 \quad (2.18)$$

Dans chaque composant optoélectronique, il est possible d'identifier un type de bruit dominant. Par exemple pour les résistances, on trouve le bruit thermique. Généralement le bruit thermique est dominant.

1.3.3. Critères de choix du détecteur

Chaque application faisant intervenir une détection d'onde électromagnétique requiert l'emploi d'un détecteur adapté à certains critères. Ces critères sont en général :

- La longueur d'onde de rayonnement à détecter, qui va conditionner le processus physique de détection à mettre en œuvre, les matériaux à utiliser;
- Le niveau du flux incident, qui pilotera le choix de la sensibilité et de la dynamique du détecteur;
- La rapidité de la réponse;

L'ensemble des propriétés qu'il est nécessaire de spécifier lors du choix ou de la comparaison de détecteurs est résumé dans le tableau 2.1 ci-dessous :

Critères de choix	Propriétés importantes
Dynamique	Seuil de sensibilité et le domaine de linéarité
Propriétés spectrales	Domaine de sensibilité (réponse spectrale)
Réponse temporelle	Temps de réponse
Bruit	Bruit de lecture, bruit propre (NEP)

Tableau 2.1 : Critères de choix du détecteur

Dans le cadre de notre application, pour la détection du signal optique émis par la diode laser à $\lambda = 670$ nm après avoir traversé le milieu, nous avons utilisé une photodiode ayant les caractéristiques techniques suivantes :

- Matériau : silicium;
- Surface active : 100 mm^2 ;
- Sensibilité : $S_{PD} = 0,4 \text{ A/W}$ à $\lambda = 670 \text{ nm}$;
- Puissance équivalente de bruit : $NEP = 10^{-12} \text{ W/Hz}^{-1/2}$;
- Courant d'obscurité : $I_{obs} = 50 \text{ nA}$;

1.3.4. Montage optoélectronique



Le montage électronique utilisé pour la mesure de la densité optique est donné sur la figure 2.3 suivante :

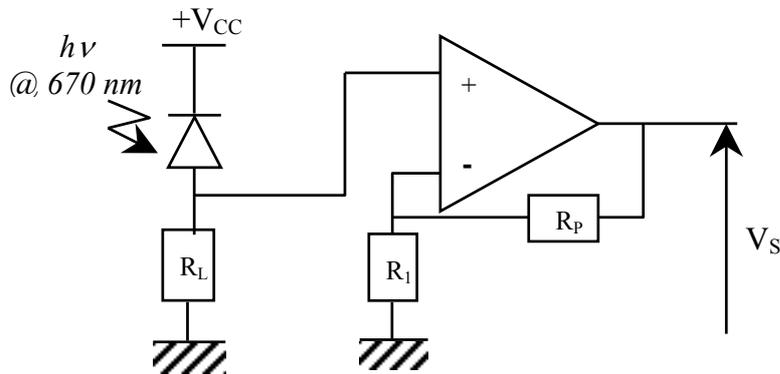


Figure 2.3 : Conditionnement de signal pour la mesure de la densité optique

La tension $+V_{CC}$ permet de polariser la photodiode en inverse, le signal utile est recueilli aux bornes de la résistance R_L sous forme de photocourant.

La photodiode dans ce montage a un mode de fonctionnement photoconducteur[17] avec les caractéristiques suivantes :

- linéarité;
- temps de réponse court;
- bande passante étendue.

1.3.5. Densité spectrale de bruit

Dans le cas de notre système de mesure, il existe trois sources de bruit : bruit électronique (bruit thermique), bruit de photon et bruit de quantification.

Les bruits de sources distinctes ne sont pas corrélés. Pour le calcul de la densité spectrale totale du bruit existant dans le montage électronique, on applique le principe de superposition. La puissance de bruit qui en résulte est la somme des puissances de bruit individuelle. Il en résulte, puisque puissance de bruit et valeurs quadratiques moyennes des tensions et courants de bruit son proportionnelles, que les tensions ou courants de bruit s'ajoutent quadratiquement.

a. Bruit électronique

Nous avons trois sources de bruit électronique (bruit thermique) :

- Résistances R_L , R_P et R_1 ;
- Amplificateur opérationnel;
- Photodiode;

Par application de la loi de superposition en électronique, on considère qu'à chaque fois, un seul composant est bruyant. On calcule donc la tension en sortie du montage et on a :

- Pour la résistance R_L : la tension V_{S1} en sortie du montage est donnée par la formule suivante :

$$V_{S1} = \frac{R_1 + R_P}{R_1} e_L \quad (2.19)$$

avec : $e_L = \sqrt{4KTR_L \Delta f}$,

Δf représente la bande passante

- Pour la résistance R_1 :

$$V_{S2} = \left(1 + \frac{R_1 + R_p}{R_1}\right) e_1 \quad (2.20)$$

avec : $e_1 = \sqrt{4KTR_1 \Delta f}$

- Pour la résistance R_p :

$$V_{S3} = e_p \quad (2.21)$$

avec : $e_p = \sqrt{4KTR_p \Delta f}$

- Pour la photodiode :

$$V_{S4} = \left(\frac{R_1 + R_p}{R_1}\right) R_L I_D \quad (2.22)$$

avec $I_D = NEP \times S_{PD} \times (\Delta f)^{1/2}$

- Pour l'amplificateur opérationnel : il contient trois sources de bruit représentées par les tensions suivantes :

$$V_{S5} = i_{nn} R_p \sqrt{\Delta f} \quad (2.23)$$

$$V_{S6} = \left(\frac{R_1 + R_p}{R_1}\right) R_L i_{np} \sqrt{\Delta f} \quad (2.24)$$

$$V_{S7} = \left(\frac{R_1 + R_p}{R_1}\right) e_n \sqrt{\Delta f} \quad (2.25)$$

L'expression de la tension efficace de bruit électronique sera donc :

$$V_S^2 = \sum_{i=1}^7 V_{Si}^2 \quad (2.26)$$

b. Bruit de photon

La puissance du bruit de photon est donnée par la relation suivante :

$$V_{Bph}^2 = \frac{hc}{\lambda_0} T_{opt}^2 S_{PD}^2 R_{eq}^2 \frac{P_0}{2.75} e^{-2DO \ln 10} \quad (2.27)$$

Avec :

- hc/λ_0 : l'énergie d'un photon;
- T_{opt} : transmission optique de tout le système;
- S_{PD} : sensibilité de la photodiode;
- R_{eq} : la résistance totale équivalente ($R_{eq} = R_L(R_1 + R_p)/R_1$);
- P_0 : puissance initiale du laser;

c. Bruit de quantification

Le bruit de quantification au niveau de la chaîne de mesure dépend de :

- n : le nombre de bit de lecture (16 bits dans notre cas);
- G_{daq} : le gain de la carte d'acquisition; le gain est ajustable en fonction de la tension en sortie du montage électronique : $G_{daq} \in \{1, 2, 5, 10, 20, 50, 100\}$;

- la tension pleine échelle (10 V est la tension maximale que la carte d'acquisition peut avoir en entrée pour atteindre la saturation en mode unipolaire. La plage de variation s'étend de 0 V à 10 V).

Le quantum $q(V_S)$ est donné par la relation suivante :

$$q(V_S) = \frac{10}{2^{16} \cdot G_{daq}} \quad (2.28)$$

avec $V_S \in \left[0, \frac{10}{G_{daq}} \right]$

Le bruit de quantification V_{Bq}^2 sera donc :

$$V_{Bq}^2 = \frac{q^2(V_S)}{12} \quad (2.29)$$

La tension efficace du bruit total V_{BT}^2 sera donc la somme de toutes les tensions efficaces des différents bruit :

$$V_{BT}^2 = \sum_{i=1}^7 V_{Si}^2 + V_{Bph}^2 \times \Delta f + V_{Bq}^2 \quad (V^2) \quad (2.30)$$

D'où l'expression finale de la tension efficace de bruit :

$$V_{BT}^2 = \left(\frac{R_1 + R_P}{R_1} \right)^2 e_L^2 + \left(1 + \frac{R_1 + R_P}{R_1} \right)^2 e_1^2 + e_p^2 + \left(\frac{R_1 + R_P}{R_1} \right)^2 R_L^2 I_D^2 + i_{nm}^2 R_P^2 + \left(\frac{R_1 + R_P}{R_1} \right)^2 R_L^2 i_{np}^2 + \left(\frac{R_1 + R_P}{R_1} \right)^2 e_n^2 + V_{Bph}^2 \times \Delta f + V_{Bq}^2 \quad (2.31)$$

le tableau 2.2 ci-dessous regroupe les valeurs des paramètres utilisés

Paramètre	Valeur
R_1	1 k Ω
R_P	130 Ω
R_L	100 k Ω
e_n	18 nV/Hz ^{1/2}
i_{np}	0,01 pA/ Hz ^{1/2}
i_{nn}	0,01 pA/ Hz ^{1/2}
k	$1,8 \times 10^{-23}$ J/K
T	298 K

Tableau 2.2 : Valeurs des paramètres

Numériquement, on trouve pour la densité de bruit électronique : $S_{be} = 26,01 \times 10^{-16} V^2/Hz$.

1.3.6. Puissance du signal utile

A partir du système de mesure, le signal détecté est donné en fonction de la transmission optique du système, la sensibilité de la photodiode, la puissance initiale du laser et en fonction de la densité optique. La puissance de la composante harmonique fondamentale est donnée par :

$$V_1^2(DO) = \frac{1}{2} T_{opt}^2 S_{PD}^2 R_{eq}^2 \left(\frac{P_0}{2.1} \right)^2 e^{-2DO \ln 10} \quad (2.32)$$

Nous avons estimé : $T_{opt} = 0,22$ à $\lambda = 670$ nm et $S_{PD} = 0,4$ A/W.

1.3.7. Rapport signal sur bruit

Compte tenu des éléments précédents, le rapport signal sur bruit est donc :

$$RSB = \frac{N}{8.8} \frac{T_{op}^2 S_{PD}^2 R_{eq}^2 P_0^2 e^{-2DO \ln 10}}{V_S^2 + 0,36 \frac{hc}{\lambda_0} T_{opt}^2 S_{PD}^2 R_{eq}^2 \Delta f P_0 e^{-2DO \ln 10} + \frac{q^2 (V_S)}{12}} \quad (2.33)$$

Nous avons $\Delta f = f_e$.

La figure 2.4 représente la courbe de variation du rapport signal sur bruit en fonction de la densité optique mesurée par simulation de l'équation (2.33).

Le rapport signal sur bruit est largement supérieur à 30 dB pour des densités optiques comprises entre 0 et 2,5. Nous constatons donc que le système de détection est suffisamment calibré pour la mesure des densités optiques inférieure à 1 car le rapport *RSB* est excellent.

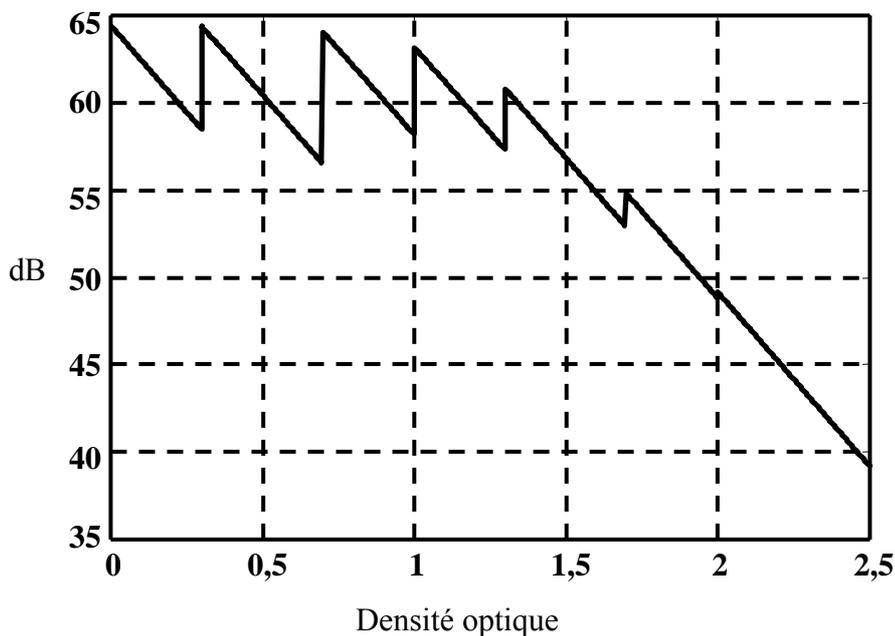


Figure 2.4 : Courbe de variation du rapport *RSB* en fonction de la densité optique (eq.(2.33))

2. Bioluminescence

2.1. Principe de mesure

La figure suivante donne un schéma simplifié du principe de mesure de bioluminescence par le biocapteur Lumisens I.

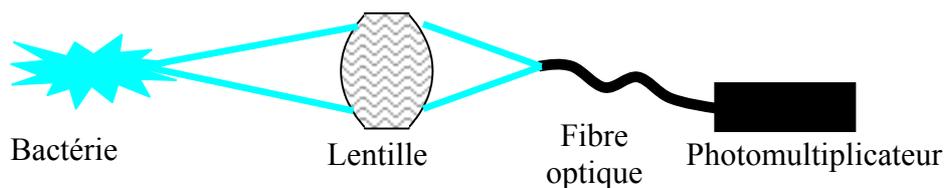


Figure 2.5 : Principe de mesure de la bioluminescence par Lumisens I

Pendant la croissance bactérienne dans le réacteur et dans des bonnes conditions de croissance microbiologique, les bactéries émettent un signal lumineux en continu centré sur la longueur d'onde $\lambda = 498 \text{ nm}$ [18] qui sera collectée par une lentille et focalisée dans une des branches d'un faisceau de fibres optiques. La lumière émise dans le réacteur est faible, pour cela nous avons choisi un détecteur optique très sensible. Il s'agit d'un photomultiplicateur (PM). La lentille est disposée afin d'éviter tout contact avec le biofilm qui se forme en surface et sur les parois internes du réacteur. Cela permet d'éviter toute contamination avec le reste du système (lentille et fibres optiques). En effet, la formation de ce biofilm peut perturber la mesure de la bioluminescence et de la densité optique. Le faisceau de fibres optiques est placé à 22 mm de la lentille (focale $f' = 15 \text{ mm}$) ce qui donne l'image d'un objet dans un plan situé à 50 mm environ de la lentille. Ainsi l'angle d'acceptance image est de $\alpha_{FO} = 13,2^\circ$. En général, l'angle d'acceptance de la fibre optique varie en fonction de la longueur d'onde de la source. Dans notre cas, nous considérons que l'angle d'ouverture est constant en fonction de la longueur d'onde car le système ne travaille pas à ouverture maximale (56°).

2.2. Conditionnement du photomultiplicateur

Le photomultiplicateur (PM) donne en sortie la mesure de bioluminescence sous forme de courant, qui, par la suite, est converti en tension à travers le montage trans-impédance et en final amplifié en sortie de l'étage d'amplification (figure 2.6).

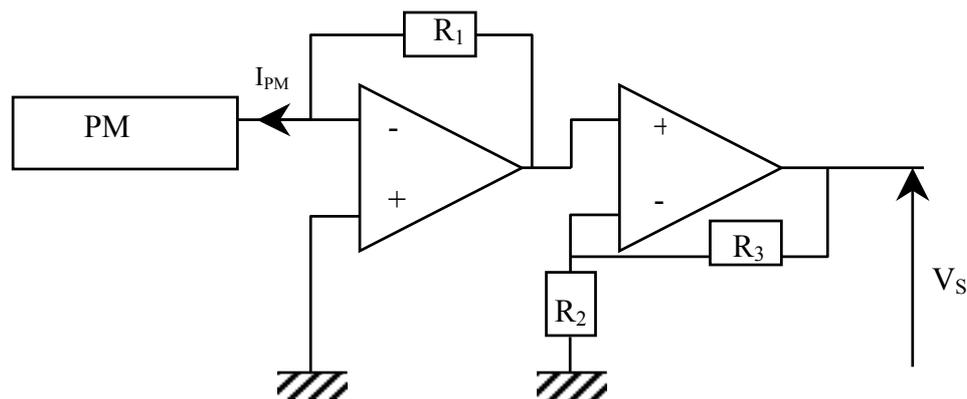


Figure 2.6 : Montage optoélectronique pour la mesure de la bioluminescence

Le photomultiplicateur a les caractéristiques techniques suivantes[19] :

- gain entre anode et cathode : varie entre 4×10^2 et $2,1 \times 10^6$ pour une haute tension de polarisation variant de 200 à 1000 V;
- courant d'obscurité de 2 nA typiquement;
- efficacité quantique de 50 % à $\lambda = 498 \text{ nm}$;
- surface active de diamètre égal à 25 mm;
- temps de montée de 4 ns et temps de transit de 30 ns.

A partir de la courbe de l'efficacité quantique du PM, on note que le PM n'est pas sensible pour détecter la lumière émise par le laser à $\lambda = 670 \text{ nm}$. A cette longueur d'onde l'efficacité quantique n'est que de 0,2 %. Cependant pour éviter les risques d'endommagement et protéger le PM en cas de fort signal du laser pour les faibles densités cellulaires, on place devant le PM un filtre passe bas ayant une longueur d'onde de coupure à $\lambda = 620 \text{ nm}$. La transmission du filtre passe bas à $\lambda = 670 \text{ nm}$ vaut 0,5 %.

2.3. Calcul de flux lumineux

2.3.1. Tension en sortie

Selon le montage de la figure 6, la tension en sortie $V_S(\lambda)$ s'écrit sous la forme :

$$V_S(\lambda) = R_g I_{PM}(\lambda) \quad (2.34)$$

Avec :

$$R_g = R_1 \frac{R_2 + R_3}{R_2} \quad (2.35)$$

$$I_{PM}(\lambda) = T_{opt}(\lambda) S_{PM} G d\phi_e(\lambda) \quad (2.36)$$

où :

- $T_{opt}(\lambda)$: transmission optique totale de la chaîne de mesure (transmission de la lentille, du faisceau de fibres optiques et du filtre passe bas) :
 $T_{opt}(\lambda) = T_L(\lambda) \times T_{FO}(\lambda) \times T_{PB}(\lambda)$;
- $S_{PM}(\lambda)$: sensibilité du photomultiplicateur;
- G : gain du photomultiplicateur;
- $d\phi_e(\lambda)$: flux lumineux émis par les bactéries dans le milieu de culture à l'intérieur du réacteur.

La relation photométrique entre le flux lumineux et la luminance de la source, si on considère que la luminance est uniforme, peut s'exprimer par :

$$d\phi_e(\lambda) = \pi \frac{\partial L(\lambda)}{\partial \lambda} \Delta S_{FO} \sin^2 \alpha_{FO} \quad (2.37)$$

où

- ΔS_{FO} : surface du faisceau de fibres optiques;
- α_{FO} : angle d'acceptance (13,2°);
- $\frac{\partial L(\lambda)}{\partial \lambda}$: luminance spectrique des bactéries constituée par la surface du milieu.

La tension en sortie V_{ST} sera donc :

$$V_{ST} = \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} V_S(\lambda) d\lambda = \pi \Delta S_{FO} \sin^2 \alpha_{FO} G R_g \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} S_{PM}(\lambda) T_{opt}(\lambda) \frac{\partial L(\lambda)}{\partial \lambda} d\lambda \quad (2.38)$$

où λ_1 et λ_2 sont les bornes du spectre de luminescence. D'après[18] on prendra $\lambda_1 = 304$ nm et $\lambda_2 = 750$ nm.

Pour estimer la relation (2.38), il est nécessaire de connaître $S_{PM}(\lambda)$, $T_{OPT}(\lambda)$ et $\frac{\partial L(\lambda)}{\partial \lambda}$.

La figure 2.7 ci-après représente les spectres de transmission du filtre passe bas, de la lentille en BK7, la sensibilité du PM et un spectre typique d'émission de la bactérie luminescente *Vibrio Fischeri*[18].

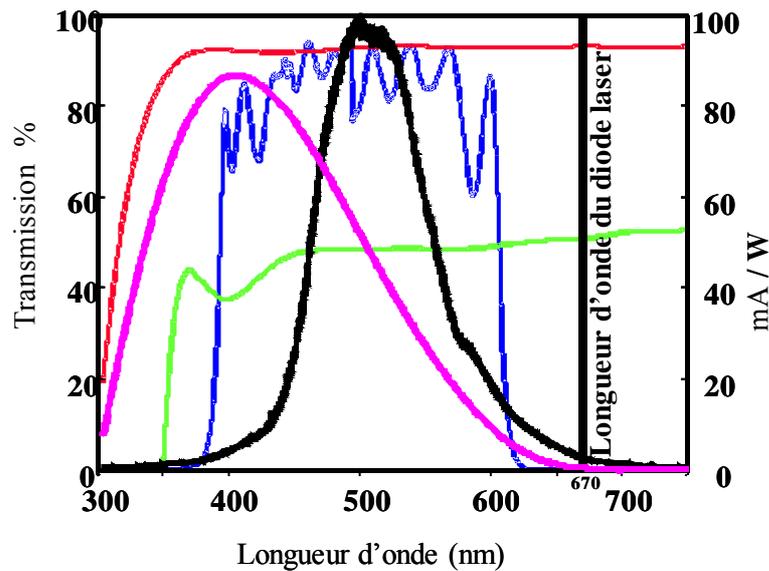


Figure 2.7 : Courbes de sensibilité spectrale (mA/W), transmission optique (%) et spectre d'émission de *Vibrio Fischeri* (unité arbitraire).

— Spectre d'émission de *Vibrio Fischeri* exprimé en unité arbitraire, — transmission de la fibre optique, — transmission du filtre passe bas, — sensibilité spectrale du PM, — transmission de la lentille (matériau BK7).

A partir des données de la figure 2.7, on peut estimer la sensibilité spectrale de la chaîne de mesure. Elle est donnée en mA/W sur la figure 2.8. Le spectre de luminescence de *Vibrio Fischeri* est également représenté en unité arbitraire à titre de comparaison.

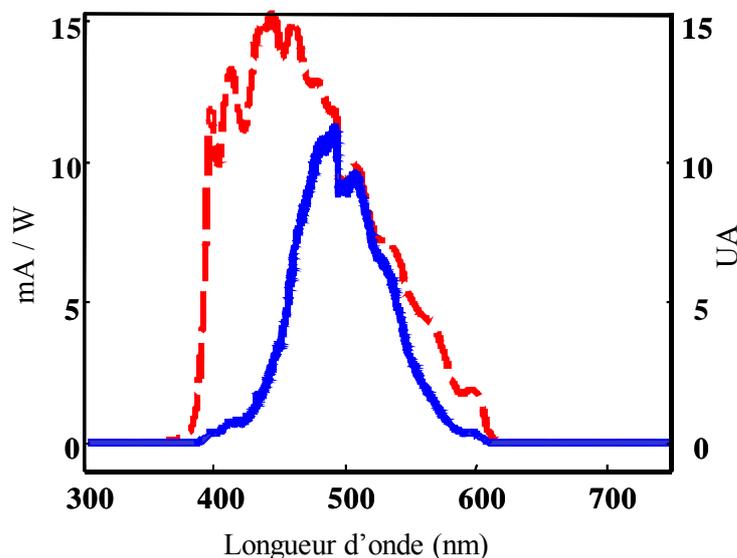


Figure 2.8 : sensibilité spectrale totale et spectre transmis

— transmission optique totale du système (mA/W),
— spectre de *Vibrio Fischeri* transmis en sortie du système (unité arbitraire)

2.3.2. Calcul du flux lumineux et de la luminance

Réécrivons l'équation (2.38) sous la forme :

$$V_{ST} = \pi \Delta S_{FO} \sin^2 \alpha_{FO} G R_g A L_{CM} \quad (2.39)$$

avec :

$$L_{CM} = \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} \frac{\partial L(\lambda)}{\partial \lambda} d\lambda \quad (2.40)$$

$$A = \frac{\int_{\lambda_1}^{\lambda_2} T_{OPT}(\lambda) S_{PM}(\lambda) \frac{\partial L(\lambda)}{\partial \lambda} d\lambda}{\int_{\lambda_1}^{\lambda_2} \frac{\partial L(\lambda)}{\partial \lambda} d\lambda} \quad (2.41)$$

Le coefficient A est un coefficient de normalisation qui ne dépend que des gènes *luxAB* responsables de la bioluminescence. A l'aide des données des courbes 2.7 et 2.8 et par calcul numérique, nous avons trouvé $A = 8,39 \times 10^{-3}$ A/W pour $\lambda_1 = 304$ nm et $\lambda_2 = 750$ nm.

A partir des équations (2.37), (2.39) et (2.40), le flux lumineux émis par les bactéries dans le milieu est donné par l'expression suivante :

$$\phi_{CM} = \frac{V_{ST}}{A G R_g} \quad (2.42)$$

et la luminance L_{CM} est estimée à partir de l'équation (2.39) par :

$$L_{CM} = \frac{V_{ST}}{\pi A G R_g \Delta S_{FO} \sin^2 \alpha_{FO}} \quad (2.43)$$

A l'aide des équations (2.38) et (2.42), il est possible de déterminer la gamme de flux détectable par le système.

La figure 2.9 représente le flux lumineux mesurable en fonction de la tension de polarisation du PM. En effet, selon les caractéristiques techniques du PM, le gain entre anode et cathode varie en fonction de la haute tension de polarisation.

Les deux bornes inférieure et supérieure du flux lumineux mesuré sont limitées respectivement par le bruit intrinsèque du PM (courant d'obscurité) et la tension maximale en entrée de la carte d'acquisition (10 V en mode unipolaire).

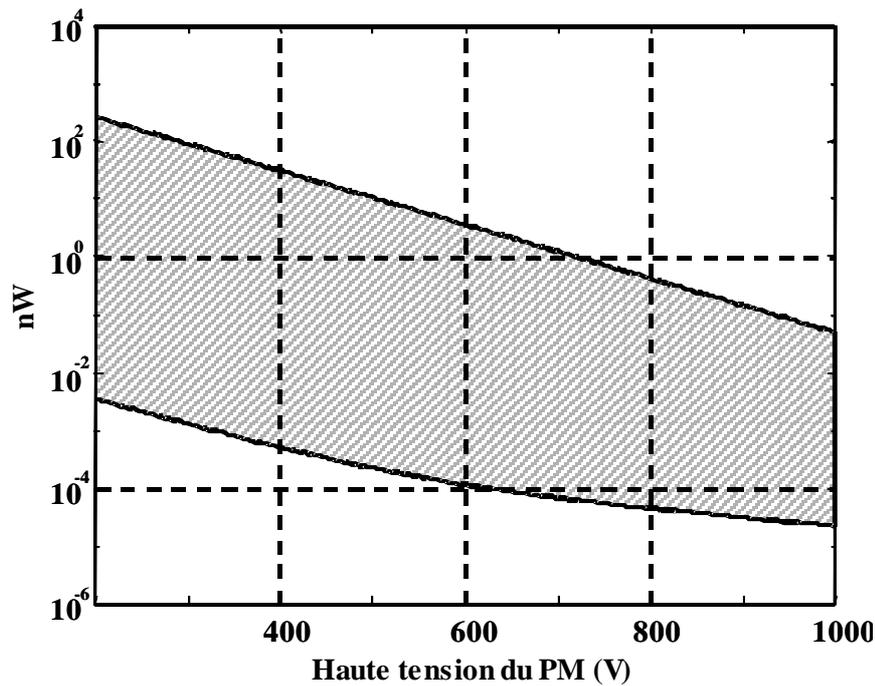


Figure 2.9 : Gamme de mesure du flux lumineux en fonction de la haute tension du PM

A partir de la figure 2.9, nous constatons que le système de mesure permet de détecter de très faibles niveaux de bioluminescence. Le flux minimum détectable est de l'ordre de 10⁻⁴ nW et au maximum, le système mesure un flux de 10² nW. La valeur maximale et minimale du flux mesurable est en fonction de la tension de polarisation du PM.

2.4. Rapport signal sur bruit (*RSB*)

Comme dans le cas du système de mesure de la densité optique, nous avons évalué l'expression du *RSB*.

2.4.1. Bruit électronique

Le bruit électronique (thermique) est calculé par application de la loi de superposition, en considérant à chaque fois la présence d'une seule source de bruit. On aura donc selon le montage de la figure 2.6 :

- Pour la résistance R_1 , la tension en sortie est

$$V_{S1} = e_1 \frac{R_2 + R_3}{R_2} \quad (2.44)$$

avec $e_1 = \sqrt{4KTR_1 \Delta f}$

Δf représente la bande passante

- Pour la résistance R_2 :

$$V_{S2} = e_2 \frac{R_3}{R_2} \quad (2.45)$$

avec $e_2 = \sqrt{4KTR_2 \Delta f}$

- Pour la résistance R_3 :

$$V_{S3} = e_3 \quad (2.46)$$

avec $e_3 = \sqrt{4KTR_3\Delta f}$

- Pour le photomultiplicateur :

$$V_{S4} = R_1 \frac{R_2 + R_3}{R_2} I_{obs} \quad (2.47)$$

avec I_{obs} : le courant d'obscurité

- Premier amplificateur opérationnel : deux sources de bruit

$$V_{S5} = \frac{R_2 + R_3}{R_2} R_1 i_{nn} \sqrt{\Delta f} \quad (2.48)$$

$$V_{S6} = \frac{R_2 + R_3}{R_2} e_{n1} \sqrt{\Delta f} \quad (2.49)$$

- Deuxième amplificateur opérationnel : trois sources de bruit

$$V_{S7} = (R_2 + R_3) i_{nn2} \sqrt{\Delta f} \quad (2.50)$$

$$V_{S8} = \frac{R_2 + R_3}{R_2} R_1 i_{np2} \sqrt{\Delta f} \quad (2.51)$$

$$V_{S9} = \frac{R_2 + R_3}{R_2} e_{n2} \sqrt{\Delta f} \quad (2.52)$$

La tension efficace du bruit électronique total présent dans le circuit de mesure sera donc :

$$V_{BST}^2 = \sum_{i=1}^9 V_{Si}^2 \quad (V^2) \quad (2.53)$$

2.4.2. Bruit de photon

Le bruit de photon V_{Bph} à la longueur d'onde λ est donné par :

$$V_{Bph}^2(\lambda) = \frac{hc}{\lambda} G^2 T_{opt}^2(\lambda) S_{PM}^2(\lambda) R_g^2 d\phi_e(\lambda) \quad (2.54)$$

La luminance étant à large spectre, nous avons donc pour la contribution totale de bruit de photon :

$$V_{TBph}^2 = \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} V_{Bph}^2(\lambda) d\lambda \quad (2.55)$$

2.4.3. Bruit de quantification

Compte tenu du paragraphe II.1.3.5.c. on a :

$$V_{Bq}^2 = \frac{q^2(V_T)}{12} \quad (2.56)$$

2.4.4. Rapport signal sur bruit



La tension efficace totale de bruit V_{BT}^2 est la somme de toutes les tensions efficaces des différents bruits :

$$V_{BT}^2 = \sum_{i=1}^9 V_{Si}^2 + V_{TBph}^2 \times \Delta f + V_{Bq}^2 \quad (2.57)$$

Le tableau 2.3 donne les valeurs des paramètres utilisés.

Paramètre	Valeur
R_1	1 M Ω
R_2	1 k Ω
R_3	10 k Ω
e_n	18 nV/Hz ^{1/2}
i_{np}	0,01 pA/ Hz ^{1/2}
i_{nn}	0,01 pA/ Hz ^{1/2}
k	$1,8 \times 10^{-23}$ J/K
T	298 K

Tableau 2.3 : Valeurs des paramètres

Finalement l'expression du RSB sera donc :

$$RSB = \frac{V_{ST}^2}{V_{BST}^2 + \Delta f \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} V_{Bph}^2(\lambda) d\lambda + q^2(V_{ST})/12} \quad (2.58)$$

La figure 2.10 représente la courbe du rapport signal sur bruit pour la mesure de bioluminescence. La courbe est donnée pour un gain du PM au maximum ($G = 2,1 \times 10^6$) et pour une bande passante $\Delta f = 2500$ Hz (car la fréquence d'acquisition pour le PM est de 5 kHz). Il correspond au minimum de RSB obtenu pour une tension de polarisation maximale. Selon cette courbe, le flux lumineux maximal mesurable qui correspond à une tension en entrée de la carte d'acquisition de 10 V, vaut $\phi_{CM}^{max} \approx 51,6 pW$ pour un RSB de 43 dB. Le minimum de flux détectable $\phi_{CM}^{min} \approx 10^{-2} pW$ pour un RSB de 16 dB qui correspond à un signal égal à deux fois le courant d'obscurité.

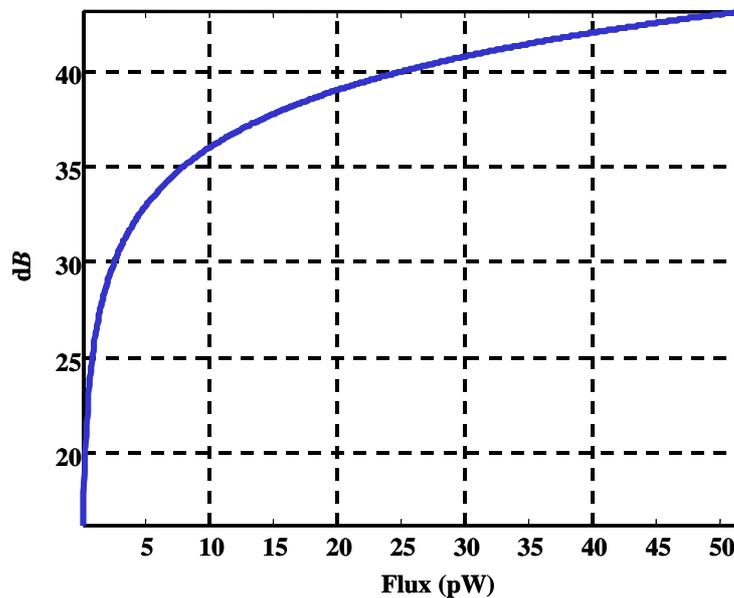


Figure 2.10 : Courbe du rapport signal sur bruit en fonction du flux lumineux mesuré

III. Biocapteur Lumisens I

Le biocapteur Lumisens I que nous avons réalisé est décrit sur la figure 2.11. Ce biocapteur permet une mesure simultanée, en continu, et in situ de la luminescence bactérienne et de la concentration cellulaire du milieu. La figure 2.12 présente la plateforme Lumisens I.

Le biocapteur Lumisens I est constitué de deux parties essentielles et complémentaires : une partie autoclavable et une partie non autoclavable.

1. Partie autoclavable

C'est une partie stérile, elle est composée du couvercle réalisé en acier inoxydable muni de microsondes pour le contrôle des conditions de croissance : sonde de pH, sonde de température et sonde d'oxygène. Sur l'axe du bioréacteur est fixé un faisceau de fibres optiques comportant deux voies, une voie pour la mesure de la bioluminescence et une seconde pour la mesure de la densité optique. L'ensemble des sondes et le faisceau de fibres optiques permettent de mesurer en temps réel, quasi simultanément la quantité de lumière émise par la suspension cellulaire, la densité optique du milieu ainsi que les paramètres de température, de pH et l'oxygène dissous par l'intermédiaire de modules spécifiques indépendants.

Sous le couvercle, on trouve une enveloppe autoclavable en verre d'un diamètre de 65 mm, dans lequel sont cultivées les bactéries. Elle peut contenir un volume de 100 mL destiné à faciliter la production, entretenir et collecter les signaux optiques issus de la bioluminescence. Les fluides (milieu de culture, cofacteurs et organoétains) sont introduits dans le bioréacteur par des pompes autorégulées.

Au sein du réacteur, les bactéries sont maintenues dans un état physiologique stable et reproductible au cours de temps par le renouvellement permanent du milieu de culture dans

une proportion adéquate. Cette technique est la culture en continu et on notera D son taux de renouvellement (voir glossaire).

Le couvercle et le corps principal (réacteur) sont assemblés de façon à ce qu'il y ait étanchéité lumineuse et stérilité du milieu de culture. La figure 2.13 représente une photo du couvercle avec les différentes connexions : circulation des fluides, sonde de pH, sonde de température, sonde d'oxygénation, et emplacement du faisceau de fibres optiques sur l'axe du réacteur.

2. Partie non autoclavable

Cette partie non stérile n'a aucun contact avec les bactéries. Elle est constituée d'une double paroi en acier avec circulation d'eau à l'intérieur de la paroi afin de maintenir le bioréacteur à une température constante. La partie inférieure du réacteur est un bloc métallique au sein duquel est introduit :

- Une diode laser avec une puissance $P = 1\text{mW}$ à $\lambda = 670\text{ nm}$ qui sera utilisée pour la mesure de la densité optique;
- Une fenêtre optique sur l'axe du bioréacteur qui assure la transmission du faisceau laser vers le milieu;
- Un système d'agitation magnétique comprenant un moteur à courant continu et un barreau magnétique. L'agitation est effectuée à l'aide d'un second barreau magnétique introduit dans le réacteur. La vitesse d'agitation est réglée manuellement par un rhéostat. Cette agitation assure une oxygénation homogène dans tout le volume.

La lumière émise est collectée par une lentille de focale $f' = 15\text{ mm}$ et ensuite guidée par le faisceau de fibres optiques à deux voies. Le bioréacteur constitue une enceinte étanche contenant le bioélément et l'analyte à détecter en solution.

Les conditions de croissance sont optimisées pour avoir une meilleure émission de bioluminescence et éviter au maximum la formation du biofilm : température adéquate (selon le type des bactéries), oxygénation suffisante, pH convenable et une agitation optimisée pour avoir un milieu homogène sans vortex au niveau de la surface.

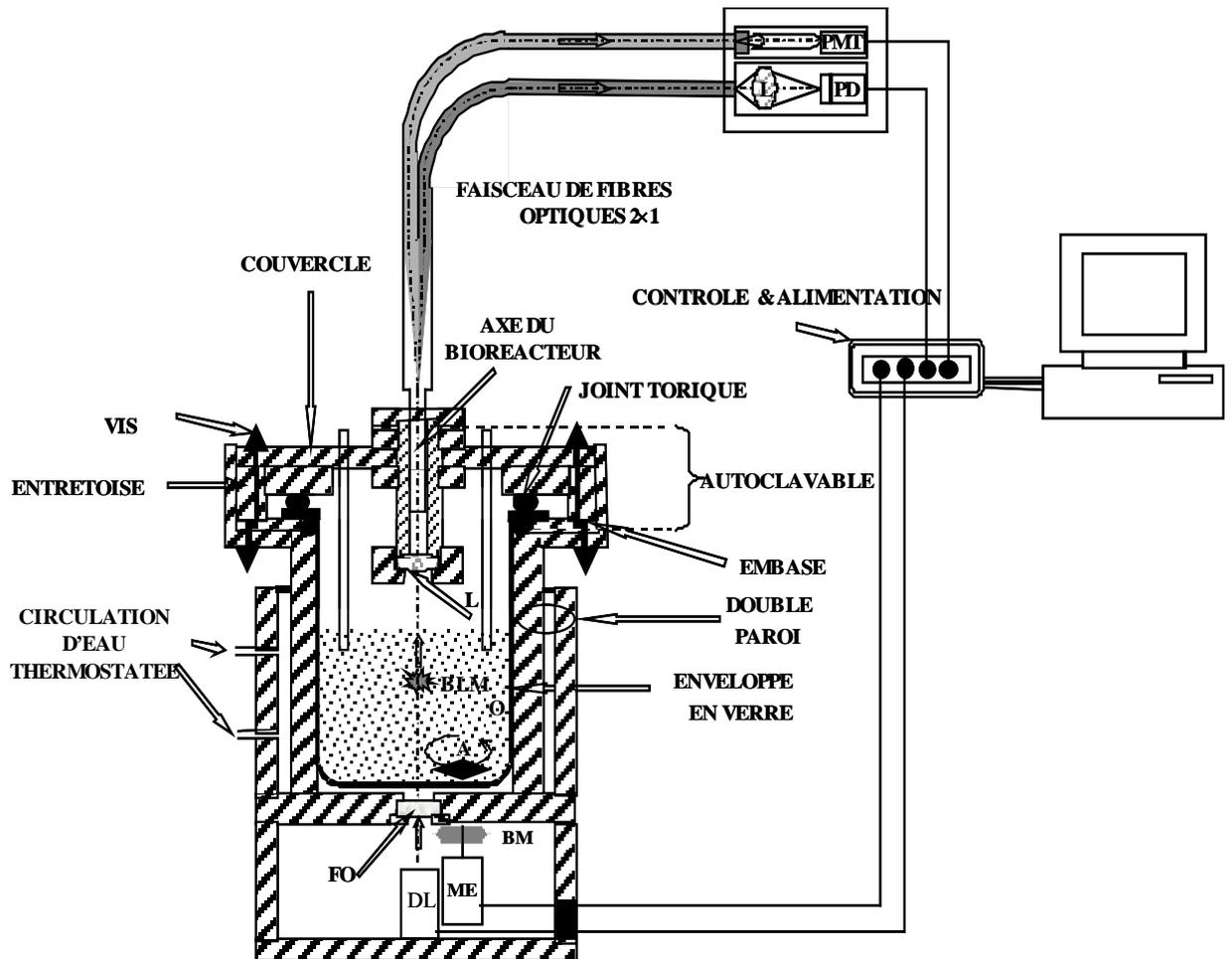


Figure 2.11 : Schéma de principe du biocapteur Lumisens I

- DL : diode laser;
- PMT : photomultiplicateur;
- PD : photodiode;
- A : agitateur;
- ME : moteur électrique;
- BLM : milieu de culture bioluminescent;
- BM : barreau magnétique;
- L : lentille;
- FO : fenêtre optique.



Figure 2.12 : Biocapteur Lumisens I et son environnement

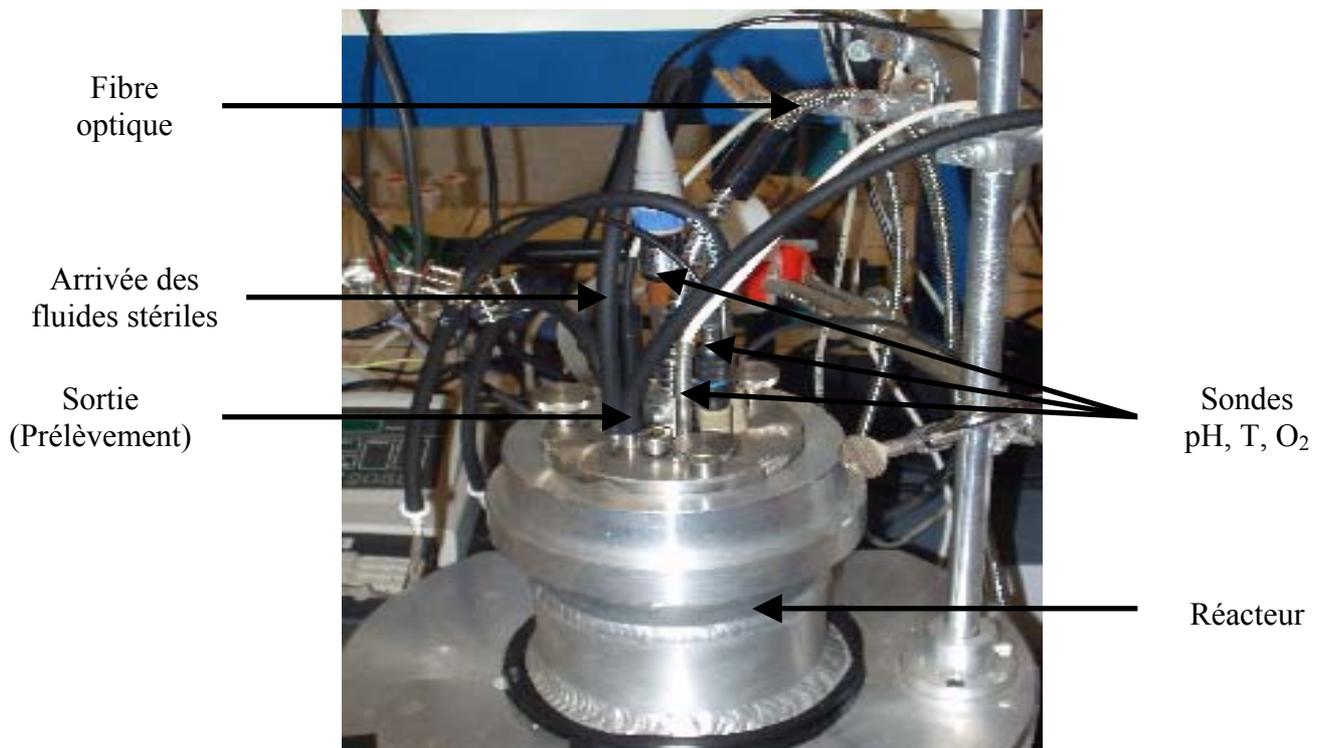


Figure 2.13 : Partie supérieure du réacteur avec les différentes sondes de mesure

3. Système d'acquisition et traitement des données

Les mesures simultanées de la bioluminescence et de la densité optique sont assurées par une carte d'acquisition gérée par un programme que nous avons développé sous Labview. La figure 2.14 présente l'organigramme du programme. Il permet de collecter les données provenant de la carte d'acquisition, de traiter ces données et de convertir directement les résultats sous forme graphique en terme d'évolution de la densité optique et de la bioluminescence en fonction du temps. Les valeurs mesurées sont enregistrées en continu au fur et à mesure de l'acquisition.

L'interface a été conçue en collaboration étroite avec l'équipe de l'IUT de La Roche sur Yon.



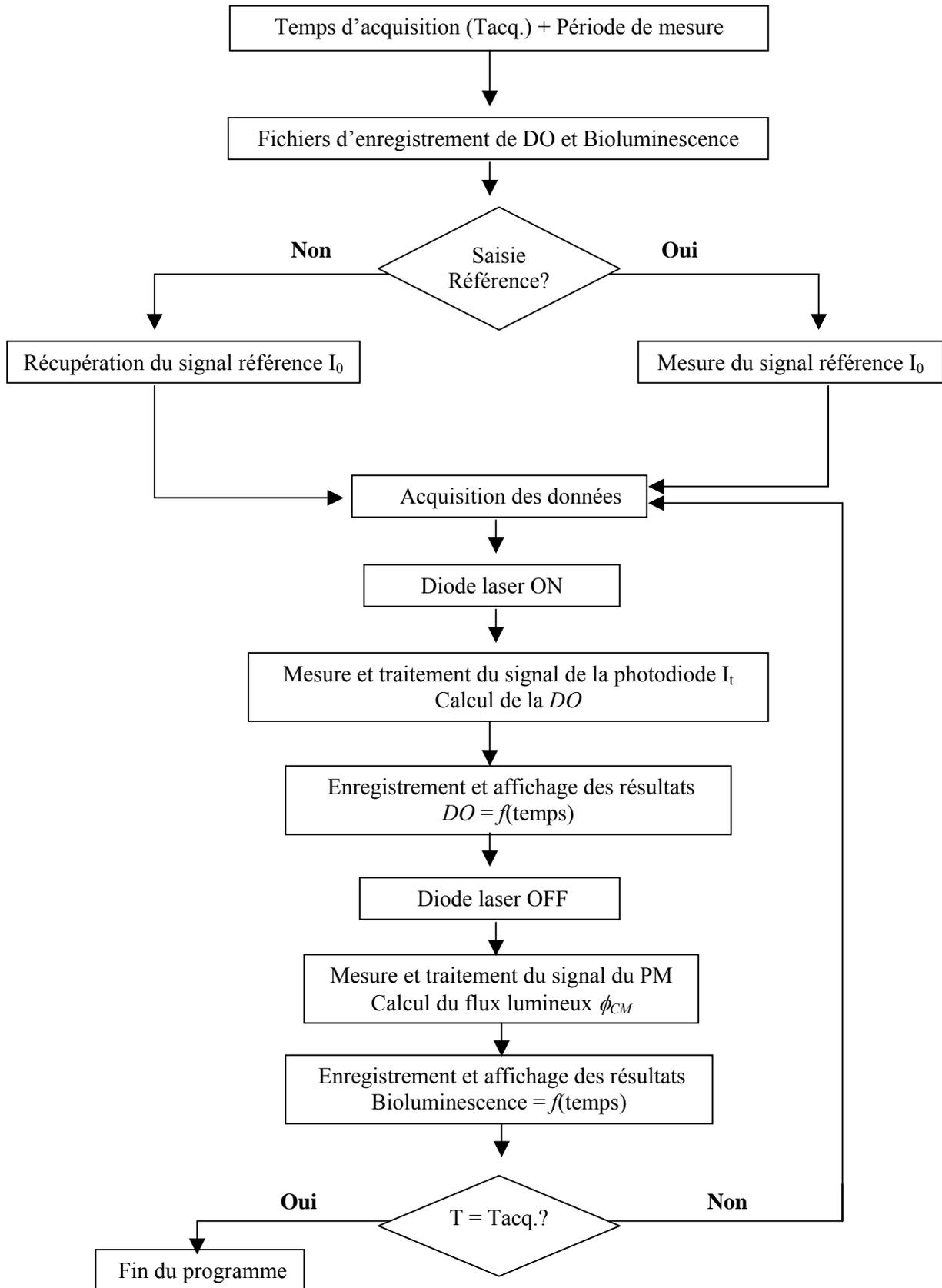


Figure 2.14 : Organigramme du logiciel d'acquisition et du traitement des données

IV. Validation expérimentale

Les résultats présentés dans ce paragraphe ont été obtenus en collaboration avec l'IUT de La Roche sur Yon (H. Horry, G. Thouand, M.J. Durand).

1. Mesure simultanée de la bioluminescence et de la densité optique

1.1. Protocole

Dans le but de valider expérimentalement le principe du biocapteur Lumisens I, nous avons comparé les résultats de la mesure simultanée de la bioluminescence et de la densité optique à des résultats obtenus par prélèvement manuel et par utilisation des appareils commerciaux déjà existants et utilisés jusqu'à présent en biologie pour ce type de mesure. Pour la densité optique, on utilise habituellement les spectrophotomètres du commerce et pour la bioluminescence, on utilise les luminomètres à microplaques. Dans ce qui suit, les mesures effectuées par le biocapteur que nous pouvons considérer comme automatiques seront notées DO_a et BL_a tandis que les mesures par prélèvement manuel seront notées DO_m et BL_m . Pour la validation du biocapteur, nous avons travaillé avec la souche *Vibrio Fischeri* cultivée en continu. C'est une souche naturellement luminescente sans ajout d'aldéhyde.

La culture en continu permet une bonne reproductibilité des expériences et un état physiologique constant des bactéries. La suspension bactérienne prélevée en sortie du réacteur pour les mesures manuelles a le même état physiologique que la suspension se trouvant dans le réacteur, l'expérience de mesure manuelle dure moins de deux minutes pour conserver cet état physiologique. Pendant la culture en continu, les mesures automatiques et manuelles de la densité optique et de la bioluminescence sont effectuées en continu pendant 7 jours. Après une telle période, la formation du biofilm augmente considérablement, ce qui perturbe les mesures automatiques et en particulier les mesures de la densité optique. La formation de biofilm au fond du réacteur provoque une absorption considérable du flux lumineux du laser avant traversé du milieu ce qui ne donne pas la valeur réelle de la densité optique.

Les mesures ont été enregistrées pendant la culture en continu pour deux taux de dilution (D), respectivement $0,6 \text{ h}^{-1}$ et 1 h^{-1} . La culture des bactéries commence tout d'abord par un « Batch », sans renouvellement du milieu de culture, jusqu'à atteindre la phase exponentielle ou les bactéries émettent un maximum de lumière ($DO_m = DO_a = 0,3$), ensuite la culture en continu commence; un flux constant de milieu de culture stérile traverse le réacteur avec un taux de dilution constant à $D = 0,6 \text{ h}^{-1}$. Dès qu'on atteint l'équilibre dynamique, la DO ne varie plus, on change le taux de dilution de $0,6 \text{ h}^{-1}$ à 1 h^{-1} pour faire varier la densité cellulaire. Les mesures automatiques sont enregistrées toutes les minutes et les mesures manuelles sont effectuées toutes les 15 minutes par prélèvement de 5 ml de la suspension en sortie du réacteur.

1.2. Préparation des bactéries et du milieu de culture

1.2.1. Préparation du milieu de culture

Le milieu de culture de la souche *Vibrio Fischeri* est un milieu appelé DSMZ n° 6904 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH). Il est préparé à partir des produits ci-dessous. Pour un litre du milieu de culture, on trouve :



- 250 mL d'eau distillée;
- 5 g de tryptone;
- 3 g d'extrait de levure;
- 4 g de NH_4Cl ;
- 750 mL d'eau de mer artificielle, préparée à partir de :
 - 28,13 g/L de NaCl ;
 - 0,77 g/L de KCl ;
 - 1,6 g/L de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$;
 - 4,8 g/L de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$;
 - 0,11 g/L de NaHCO_3 ;
 - 3,5 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$;

1.2.2. Préparation de la souche *Vibrio Fischeri*

La souche *Vibrio Fischeri* (CIP n° 103206 T) est fournie par l'institut Pasteur. C'est une souche naturellement luminescente. Les bactéries ont été cultivées à une température de 25°C sous agitation et aération ($150 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, air atmosphérique) dans un volume de 100 ml. Ces conditions de culture ont été choisies afin d'éviter les fortes densités optiques, c'est à dire des $\text{DO} > 1,0$. En effet, dans le cas contraire la bioluminescence pourrait diminuer en raison d'un manque d'oxygène et ou de phénomènes de quenching pour les très fortes concentrations.

1.3. Mesure de bioluminescence

Les mesures manuelles de la bioluminescence sont effectuées à l'aide d'un luminomètre qui est l'appareil utilisé dans les laboratoires de microbiologie pour ce genre de mesure. Un volume de 1 ml de la suspension bactérienne est prélevé au sein du réacteur et distribué dans neuf puits de la microplaque, chaque puit contenant $100 \mu\text{l}$. Les mesures sont effectuées à $T = 25^\circ\text{C}$. La bioluminescence mesurée manuellement est la moyenne des valeurs données par les neuf puits. Notons que les mesures manuelles sont données en $\text{RLU} \cdot \text{s}^{-1}$ (**R**elative **L**ight **U**nit : unité arbitraire) et les mesures automatiques sont exprimées en pW puisque Lumisens I donne une estimation absolue du flux lumineux (équation (2.42)).

Pour les mesures automatiques, la tension de polarisation du PM a été réglée à 830 V, ce qui donne un gain de 332840. Connaissant le gain du PM, il est alors possible de calculer la valeur du flux lumineux émis en appliquant l'équation (2.42) et la luminance avec l'équation (2.43).

La figure 2.15 donne les résultats obtenus par Lumisens I (BL_a) et par le luminomètre (BL_m). Les barres d'erreur de la mesure automatique ne sont pas montrées car elles sont très faibles.

La première période qui dure 250 minutes correspond à la culture en continu avec un taux de dilution de $0,6 \text{ h}^{-1}$. Selon la figure, on constate une forte baisse de la bioluminescence mesurée par Lumisens I d'une valeur de 155 pW pour atteindre un signal stable à 55 pW. On constate cette même tendance pour les mesures par le luminomètre avec une décroissance de 5×10^6 à $3 \times 10^6 \text{ RLU} \cdot \text{s}^{-1}$. Pour la deuxième plage de mesure qui correspond à $D = 1 \text{ h}^{-1}$, la bioluminescence continue à diminuer jusqu'à atteindre à nouveau l'équilibre dynamique pour une valeur de 10 pW avec Lumisens I et $5 \times 10^5 \text{ RLU} \cdot \text{s}^{-1}$ avec le luminomètre.

Selon l'équation (2.43), la luminance totale des bactéries est estimée à $6 \times 10^{-5} \text{ W} \cdot \text{sr}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ pour un angle d'acceptance $\alpha_{FB} = 13,2^\circ$ et une surface de fibre optique $S_{FO} = 16 \text{ mm}^2$.

La figure 2.16 représente la courbe de corrélation entre les deux méthodes de mesure de la bioluminescence. La corrélation entre les deux séries de mesures est satisfaisante puisque le coefficient de corrélation est de 0,76.

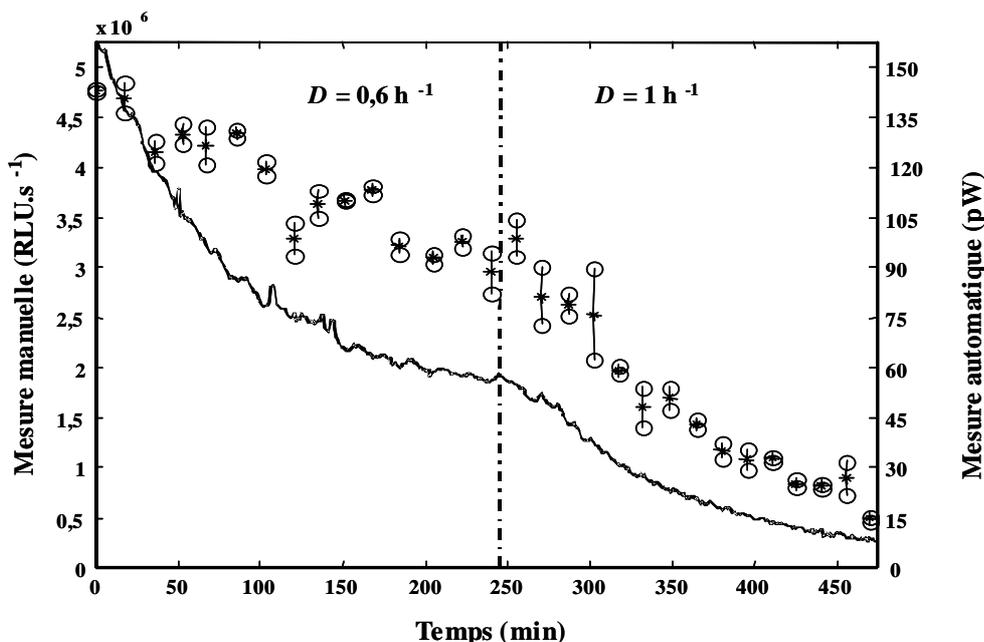


Figure 2.15 : Validation de la mesure de bioluminescence
 — mesure automatique avec Lumisens I
 * mesure manuelle, o barres d'erreur à 2σ

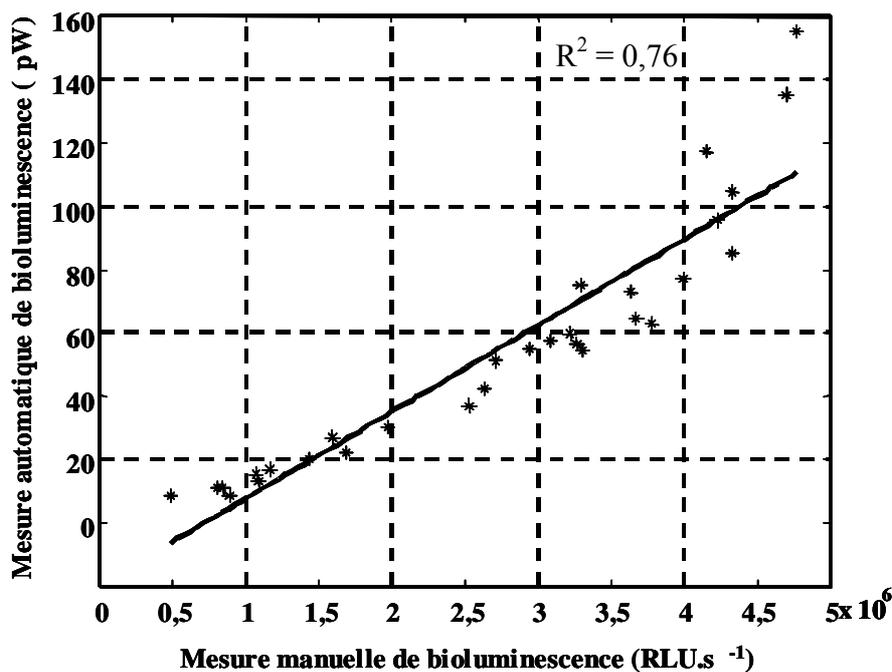


Figure 2.16 : Corrélation entre les deux méthodes de mesure de la bioluminescence
 (— modèle linéaire, * mesure)

1.4. Mesure de la densité optique

Les mesures manuelles de la densité optique sont effectuées avec un spectrophotomètre du commerce qui est l'appareil utilisé classiquement dans les laboratoires pour ce type de mesure. Un volume de 1 ml de la suspension bactérienne prélevé dans le réacteur est utilisé pour mesurer DO_m . Les mesures manuelles sont effectuées à $\lambda = 670$ nm ce qui correspond à la même longueur d'onde que celle de la diode laser utilisée dans Lumisens I. L'épaisseur du

liquide traversée par le faisceau lumineux, dans la cuve du spectrophotomètre, est de 10 mm. La figure 2.17 compare les résultats obtenus avec Lumisens I et le spectrophotomètre du commerce.

La première période qui dure 250 minutes correspond à la culture en continu avec un taux de dilution de $0,6 \text{ h}^{-1}$. La culture en continu a commencé à une densité optique de 0,3 ($DO_m = DO_a = 0,3$). La densité optique mesurée décroît d'une valeur de 0,3 à 0,23 ou l'équilibre dynamique est atteint, ensuite, le taux de dilution a été changé de $0,6 \text{ h}^{-1}$ à 1 h^{-1} , la densité optique continue à diminuer jusqu'à un signal stable qui correspond à un nouvel équilibre dynamique pour une DO de 0,07. Nous pouvons observer sur la figure 2.17 que les deux méthodes donnent les mêmes tendances dans les deux cas de taux de dilution.

La figure 2.18 représente la courbe de corrélation entre les deux méthodes de mesure de densité optique. Nous avons une bonne corrélation entre les deux mesures avec un coefficient de corrélation $R^2 = 0,89$.

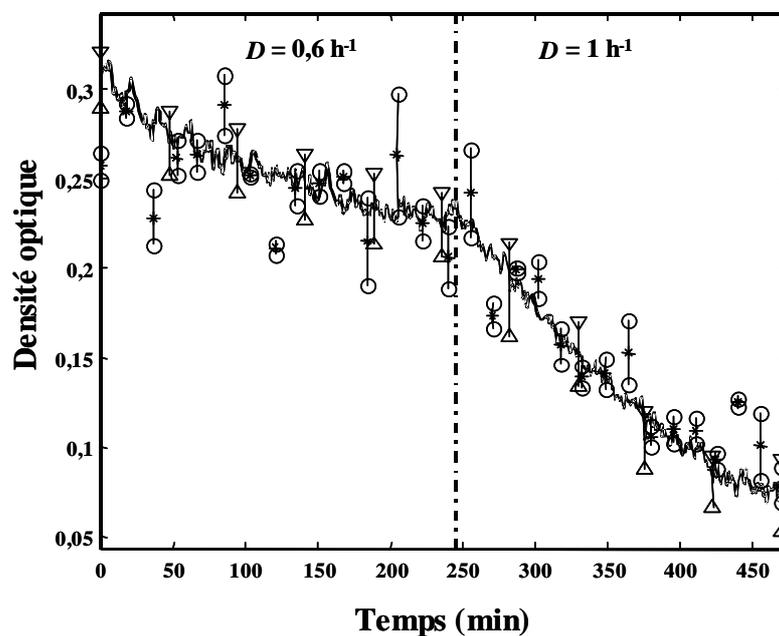


Figure 2.17 : Validation de la mesure de densité optique
 — mesure automatique par Lumisens I, Δ barres d'erreur à 2σ
 * mesure manuelle, o barres d'erreur à 2σ

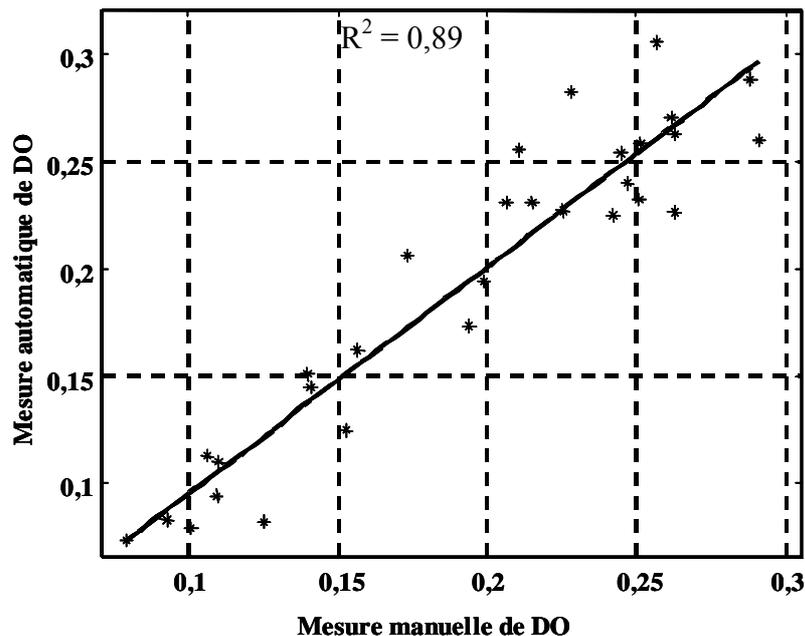


Figure 2.18 : Corrélation entre les deux méthodes de mesure de la densité optique (— modèle linéaire, * mesure)

2. Application de Lumisens I à la détection d'organoétains

Dans le cadre du programme de recherche du contrat état-région 2000-2006, notre objectif est de montrer que ce biocapteur est capable de détecter des substances de type organoétains. Nous avons donc appliqué Lumisens I à la détection du tributyl-étain (TBT) avec la bactérie *Escherichia coli* TBT3 (que nous appelons TBT3) qui émet de la lumière en présence de TBT. On rappelle que TBT3 est une bactérie modifiée génétiquement avec les gènes *luxAB* provenant de la bactérie *Vibrio Harveyi*. Par conséquent, il est nécessaire d'apporter un aldéhyde longue chaîne (dans notre cas le décanal) qui est un des cofacteurs de la réaction. La figure 2.19 montre les résultats obtenus pour la détection de TBT.

A $t = 0$ minutes, on introduit dans le bioréacteur 100 ml de milieu de culture contenant 20 ml de bactéries TBT3. La culture est effectuée en « batch » jusqu'à $t = 500$ minutes ce qui permet aux bactéries de se diviser et de croître. A $t = 500$ minutes, on active la culture en continu; un flux constant de milieu de culture stérile traverse le réacteur avec un taux de dilution constant $D = 0,9 \text{ h}^{-1}$. Après une courte période de lessivage des cellules, le taux de croissance des bactéries compense le flux de milieu car il y a un équilibre dynamique entre les nouvelles cellules qui apparaissent dans le réacteur par division et celles qui le quittent en raison du flux de milieu. A $t = 1800$ minutes, un état d'équilibre dynamique est atteint, le nombre de cellules nouvelles qui apparaissent dans le réacteur est égal au nombre de cellules qui le quittent; les cellules sont dans un état physiologique constant au cours du temps. Cela se traduit par la stationnarité de la courbe de DO. A ce moment on ajoute $300 \mu\text{M}$ de décanal, ce qui rompt l'état d'équilibre car on change les conditions de culture. A $t = 2800$ minutes, on injecte $1,25 \mu\text{M}$ de TBT, ce qui se traduit 50 minutes plus tard par l'apparition d'un pic de luminescence de l'ordre de $0,19 \text{ pW}$ d'amplitude. Le temps de recouvrement est de l'ordre de 500 minutes. A $t = 4020$ minutes et $t = 5500$ minutes, on injecte à nouveau du TBT, respectivement $1,25 \mu\text{M}$ et $0,125 \mu\text{M}$. Le biocapteur montre deux pics de luminescence de $0,18$ et $0,09 \text{ pW}$

d'amplitudes discernables du bruit de catalyse, du à la présence de décanal qui se confond sur la figure avec le bruit de fond.

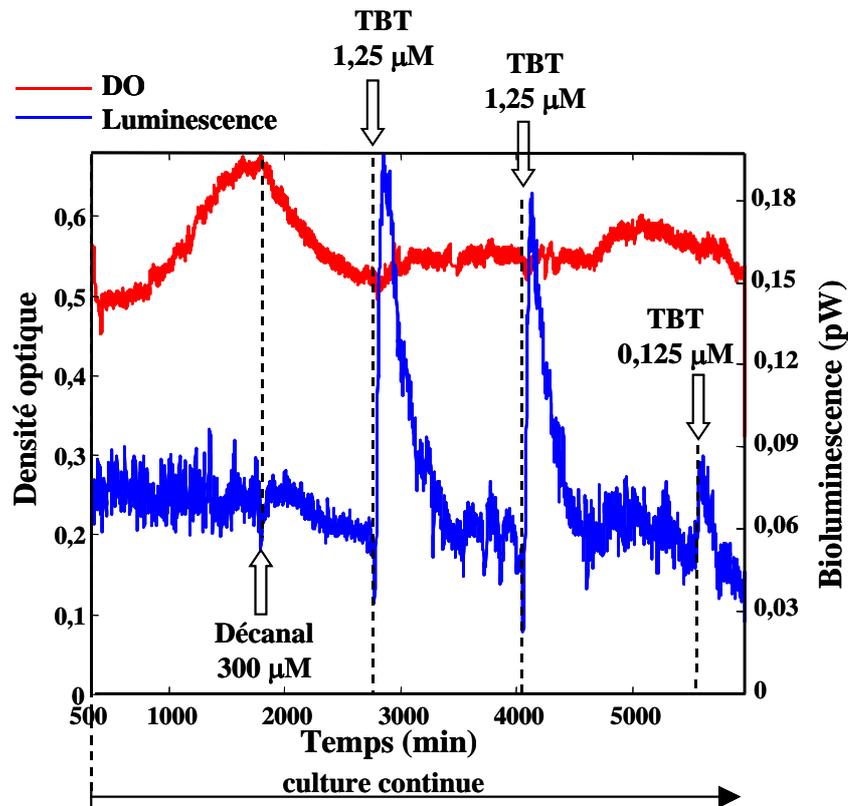


Figure 2.19 : Application de Lumisens I à la détection du TBT[20]

A partir de la courbe de luminescence de la figure 2.19, on note les performances suivantes de Lumisens I :

- Temps de réponse : $t_R = 50$ minutes, correspond au temps entre l'ajout du TBT et le pic maximal;
- Temps de recouvrement : $t_{Rec} = 500$ minutes, correspond au temps nécessaire pour retrouver l'équilibre dynamique, après l'ajout de $1,25 \mu\text{M}$ de TBT;
- Limite de détection de TBT : $C_{Min}(\text{TBT}) = 0,125 \mu\text{M}$ dans un volume total de 100 mL.

3. Effet de volume sur la luminance totale des bactéries

3.1. Objectif

Après avoir validé expérimentalement le principe de mesure du biocapteur Lumisens I, nous avons évalué l'influence du volume du milieu sur la luminance totale de la source constituée par les bactéries luminescentes en fonction de sa concentration cellulaire.

L'étude de la luminance de la source de lumière en fonction de ces paramètres (volume, concentration) permet de comprendre comment le milieu contribue à la luminance totale de la source. Cette connaissance permettra d'entreprendre la miniaturisation du biocapteur. En effet, il est possible qu'à une concentration donnée, il existe un volume optimal au-delà duquel la luminance n'augmente plus.

La réponse à cet objectif paraît facile dans un premier temps mais sa démonstration est plus difficile. En effet, puisque nous mesurons le flux lumineux émis dans le réacteur, il est primordial que les conditions opératoires (agitation, oxygénation, température, étendue géométrique du système) soient constantes.

3.2. Effet du volume du milieu réactionnel sur la luminance d'une réaction de bioluminescence

Après des essais préliminaires, nous avons adopté le protocole suivant pour la bioluminescence : la bactérie *Vibrio Fischeri* est cultivée en continu avec un taux de dilution $D = 0,5 \text{ h}^{-1}$ et une température de 25°C dans un réacteur de type « NewBrunswick » de 2 litres afin de garantir une activité physiologique reproductible et une densité optique constante. Le volume adéquat de culture a été ensuite introduit dans le réacteur de Lumisens I et la bioluminescence est mesurée. En parallèle, on mesure la bioluminescence avec le luminomètre et la DO avec le spectrophotomètre pour être certain d'utiliser des bactéries ayant le même état physiologique.

Nous avons travaillé à une densité optique constante ($DO = 0,5$) et à une distance de détection constante entre la lentille et la surface du milieu pour conserver l'étendue géométrique du système optique. Le seul paramètre qui varie est le volume. Entre deux mesures, on rince le réacteur avec l'eau de mer pour rester dans les mêmes conditions.

La figure 2.20 montre les résultats obtenus pour la bioluminescence en appliquant le protocole. On constate que plus le volume augmente plus la bioluminescence émise dans le réacteur augmente. Nous constatons aussi qu'à partir d'un volume de 50 mL, la lumière détectée n'augmente que faiblement. Ceci s'explique par le fait que pour une certaine hauteur du liquide, les photons émis au fond du réacteur n'arrivent pas à la surface du liquide et ne contribuent pas à la luminance de la source. Cela est dû au phénomène de diffusion et d'absorption présents dans le réacteur qui piège les photons dans le milieu. La diffusion est liée à la concentration cellulaire : plus la densité cellulaire augmente plus la diffusion augmente.

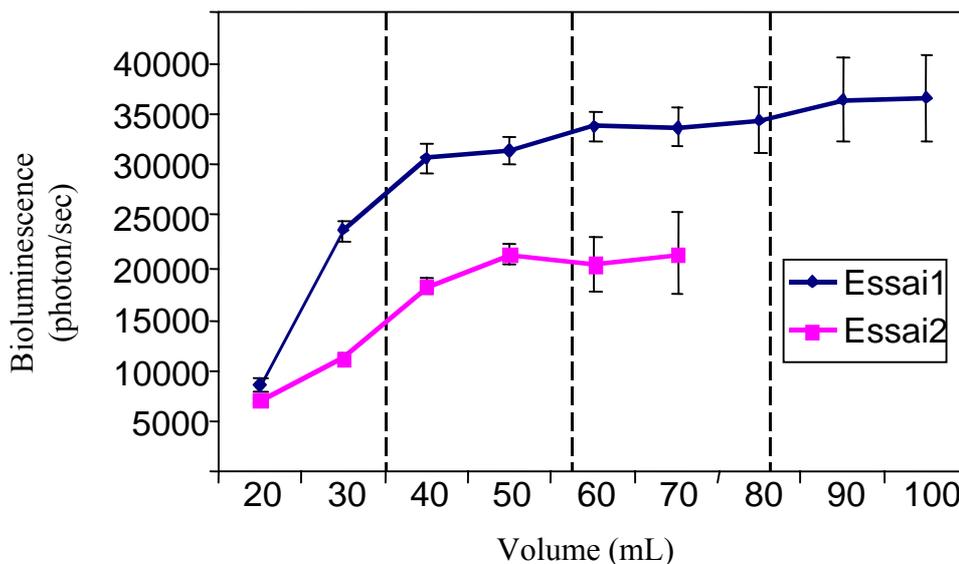


Figure 2.20 : Effet de volume sur la bioluminescence mesurée par Lumisens I

D'après les résultats obtenus, nous constatons que, pour une densité optique de 0,5, le volume utile dans le réacteur est de 50 mL, c'est le volume qui contribue à la luminance de la source. Ce volume est fonction de la concentration cellulaire. Pour les deux essais effectués avec la même densité cellulaire, on obtient le même volume utile avec une différence de niveaux lumineux entre les deux essais.

V. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons présenté un nouveau biocapteur original en phase liquide : **Lumisens I**. C'est un biocapteur bactérien monocanal et multifonction. Il permet la mesure in situ et simultanée de la densité optique et de la bioluminescence pour le contrôle de croissance des bactéries.

Selon les résultats présentés, nous avons montré la faisabilité et l'intérêt de ce biocapteur. Nous avons montré une très bonne corrélation entre les mesures automatiques effectuées avec Lumisens I, mesures effectuées en ligne, et les mesures effectuées par prélèvement manuel avec les appareils de mesures utilisés classiquement dans les laboratoires.

Avec le logiciel que nous avons développé, le biocapteur est autonome et il permet d'enregistrer au fur et à mesure les résultats de la densité optique et de la bioluminescence en fonction du temps écoulé. Cette interface développée en étroite collaboration avec les microbiologistes offre un lien facile entre l'acquisition de données et l'affichage de résultats.

Lumisens I a été appliqué pour la détection des organoétains tel que le tributyl étain (TBT) en utilisant une bactérie modifiée génétiquement, *Escherichia coli TBT3*, sensible à la présence de TBT. Ce biocapteur permet de détecter des concentrations faibles de toxique dans un grand volume. En effet, nous avons montré que la limite de détection dans un volume de 100 mL est de l'ordre de 0,125 μ M.

En parallèle avec ce travail, les microbiologistes de l'IUT de La Roche sur Yon s'intéressent à l'optimisation de ce biocapteur[21]. En effet, leur travail consiste à relier les performances du biocapteur (temps de réponse, temps de recouvrement, production de lumière) avec les paramètres biologiques (taux de dilution, température, concentration en substrat, pH, O₂, ...).

Le biocapteur Lumisens I a fait l'objet d'un brevet français enregistré à l'INPI sous le numéro 0113518.

Ce chapitre a fait l'objet de deux publications, dans *Review of Scientific Instruments*[22] et *Sensors & Actuators B*[23].

Le biocapteur Lumisens I sera utilisable pour l'analyse, la mesure et le contrôle de la qualité des procédés et des produits ainsi que pour déterminer leur impact sur les écosystèmes et l'homme. Sont particulièrement concernés : les laboratoires d'analyses médicales et vétérinaires, les entreprises agro-alimentaires, les sociétés de service en environnement, et les sociétés de traitement de l'eau et des déchets.



VI. Références

1. N.S. Hobson, I. Tothill, A.P.F. Turner, Microbial detection, *Biosensors and Bioelectronics*, **11** (1996) 455-477.
2. A. Singh, R.C. Kuhad, V. Sahai, P. Ghosh, Evaluation of biomass, *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, **51** (1994) 47-70.
3. M.W. Griffiths, Rapid microbiological methods with hazard analysis critical control point, *Journal of AOAC International*, **80** (1997) 1143-1150.
4. B. Swaminathan, P. Feng, Rapid detection of food-borne pathogenic bacteria, *Annual Review of Microbiology*, **48** (1994) 401-426.
5. G. Thouand, M.J. Durand, P. Picart, Ph. Daniel, J. Massé, M.S. DuBow, Detection of bacteria in the food industry with bioluminescent sensors, *Recent Res. Devel. Microbiol.*, **5** (2001) 79-93.
6. K.G. Ong, J. Wang, R.S. Singh, L.G. Bachas, C.A. Grimes, Monitoring of bacteria growth using a wireless, remote query resonant-circuit sensor : Application to Environmental Sensing, *Biosensors and Bioelectronics*, **16** (2001) 305-312.
7. F. Marincs, On-line monitoring of growth of Escherichia coli in batch cultures by bioluminescence, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **53** (2000) 536-541.
8. I. Bronstein, J. Fortin, P.E. Stanley, G.S.A.B. Stewart, L.J. Kricka, Chemiluminescent and bioluminescent reporter gene assays, *Analytical Biochemistry*, **219** (1994) 169-181
9. R.J. Ellis, A.G. Wright, Optimal use of photomultipliers for chemiluminescence and bioluminescence applications, *Luminescence*, **14** (1999) 11-18.
10. J.L. Blum, Bio-and chemi-luminescent sensors, *World Scientific Publishing*, Singapore, London (1997).
11. P.O. Byrne, T.S.J. Elliott, P.R. Sisson, P.D. Oliver, H.R. Ingham, An optical probe for the enumeration of bacteria in liquid media, *Journal of Physics E : Scientific Instruments*, **22** (1989) 146-150.



12. R. Salzer, G. Steiner, H.H. Manrsch, J. Mansfield, Fresenius, Infrared and Raman imaging of biological and biomimetic sample, *Journal of Analytical Chemistry*, **366** (2000) 712-726.
13. K.C Schuster, E. Urlaub, J.R. Gapes, Single-cell analysis of bacteria by Raman microscopy : Spectral information on the chemical composition of cells and on the heterogeneity in a culture, *Journal of Microbiological Methods*, **42** (2000) 29-38.
14. M.B. Gu, P.S. Dhurjati, T.K. Van Dyk, R.A. LaRossa, A miniature bioreactor for sensing toxicity using recombinant bioluminescent *Escherichia coli* cells, *Biotechnology Progress*, **12** (1996) 393-397.
15. M.B. Gu, G.C. Gil, J.H. Kim, A two-stage minibioreactor system for continuous toxicity monitoring, *Biosensors and Bioelectronics*, **14** (1999) 355-361.
16. G. Blanchet, J. Prado, Méthodes numériques pour le traitement du signal, *Edition Masson Paris*, ISBN 2-225-82321-9 (1991).
17. G. Asch, Les capteurs en instrumentation industrielle, *Edition Dunod Paris*, (1991) 195-206.
18. G. Thouand, Ph. Daniel, H. Horry, P. Picart, M.J. Durand, K. Kilham, O.G.G. Knox, M.S. Dubow, M. Rousseau, Comparison of the spectral emission of lux recombinat and bioluminescent marine bacteria, *Luminescence*, **18** (2003) 145-155.
19. Technical data sheet, Photomultiplier tubes and related products, *Hamamatsu Photonics K.K.*, June 2002.
20. H.Horry, M.J.Durand, P.Picart, L.Bendriaa, Ph.Daniel, G.Thouand, development of a biosensor for the detection of Tributyltin, *Environ. Toxicol.*, **19** (2004) 342-345.
21. H. Horry, Développement d'un biocapteur bactérien bioluminescent pour la détection d'organoétains, *thèse de l'Université de Nantes en microbiologie*, 2004.
22. P. Picart, L. Bendriaa, H. Horry, Ph. Daniel, M.J. Durand, L. Jouvanneau, G. Thouand, A new bioreactor for in-situ simultaneous measurement of bioluminescence and cell density, *Review of Scientific Instruments*, **75** (2004) 747-755.
23. L. Bendriaa, P. Picart, Ph. Daniel, H. Horry, M.J. Durand, G. Thouand, Versatile device for on-line and in-situ measurement of growth and light production of bioluminescent cells, *Sensors and Actuators B*, **103** (2004) 115-121.



Chapitre III

Biocapteur luminescent multicanal

Lumisens II





I. Introduction

Au cours du chapitre précédent, nous avons présenté un biocapteur en phase liquide. Ce système utilise des bactéries luminescentes cultivées dans un milieu liquide dont tous les paramètres sont contrôlés. La détection d'une substance toxique est assurée par la spécificité de la bactérie cultivée dans le mini bioréacteur. Ce dispositif est donc monocanal en ce sens qu'il ne permet pas l'analyse d'une multitude de composés. Bien qu'il soit un outil d'étude extrêmement puissant, il nécessite une préparation liquide et des compétences pour la culture du milieu. De futurs opérateurs devraient donc être de niveau suffisant pour utiliser correctement cet outil. Ce dernier point peut rendre la phase d'industrialisation de ce prototype délicate.

Pour contourner ces inconvénients, l'équipe de recherche a envisagé la mise au point d'un biocapteur en phase immobilisée, c'est à dire avec des bactéries vivantes piégées dans un gel. L'idée conductrice est de miniaturiser et simplifier au maximum les protocoles de préparation et de mesure. En effet, des bactéries stockées dans une pastille de gel plus petite qu'une pastille d'aspirine représenteront un volume inférieur aux 100ml du mini-bioréacteur de Lumisens I. L'avantage principal d'un biocapteur en phase immobilisée concerne les aspects multi-sensibilités. On imagine aisément qu'il serait possible d'utiliser différentes pastilles construites avec des bactéries dont les spécificités aux substances toxiques sont différentes; le biocapteur serait donc multicanal ce qui représenterait une avancée considérable par rapport au premier prototype. On pourrait ainsi envisager de détecter simultanément des substances ou métaux tels que arsenic, chrome, aluminium, tributylétain, cobalt, nickel, cuivre, argent, or, zinc, cadmium, mercure, plomb, etc. en disposant d'un cocktail de bactéries spécifiques à ces substances.

Le développement d'un biocapteur luminescent multicanal en phase immobilisée est un travail qui requiert des compétences transversales : microbiologie, encapsulation, optique, électronique et informatique. Ce caractère transverse a été obtenu grâce à une collaboration entre les Universités de Nantes, du Maine et l'ENITIAA de Nantes. Cette thèse, à travers ce chapitre, a contribué au dimensionnement du nouveau biocapteur, essentiellement pour la partie concernant la détection de la bioluminescence bactérienne. Ce biocapteur luminescent original a été baptisé « **Lumisens II** ». Le développement du biocapteur Lumisens II représente l'étape finale de la recherche financée par le cadre du CER 2000-06 « Biocapteurs luminescents ». Ce biocapteur doit permettre de détecter simultanément plusieurs polluants. Les bactéries répondent chacune à un ou plusieurs polluants et sont immobilisées sur une carte jetable amovible alimentée en permanence par l'effluent à analyser. Le concept de base de ce biocapteur est protégé par une enveloppe Soleau[1]. La mise au point de ce biocapteur suit la démarche qui a été adoptée pour le biocapteur « Lumisens I » à savoir : l'établissement d'un cahier des charges et la conception de la carte multicanale par l'équipe de l'IUT de La Roche sur Yon, la conception de la partie opto-mécanique par l'équipe de l'Université du Maine et la validation du biocapteur en collaboration avec l'équipe de l'IUT de La Roche sur Yon.

Le Chapitre III présente donc les choix adoptés pour la nouvelle architecture Lumisens II. Il est à noter que l'état de l'art des biocapteurs multicanaux en phase immobilisée est vierge (à notre connaissance) et que le futur prototype constituera un dispositif pionnier.



II. Biocapteur multicanal Lumisens II

1. Architecture

Le dispositif expérimental retenu est décrit schématiquement sur la figure 3.1.

Lumisens II est composé de :

- une carte MBC, « Mini-Bio-Chip », équipée d'un dispositif de circulation microfluidique; cette carte contient un certain nombre de puits, dans lesquels seront immobilisées des bactéries luminescentes, parcourus par un fluide contenant le milieu à étudier; le choix du matériau, les dimensions des puits (diamètre, forme, épaisseur) et le matériau d'immobilisation sont des paramètres primordiaux dans le dimensionnement de la carte MBC,
- un détecteur matriciel avec un objectif de formation des images; ce système formera l'image de la carte MBC sur le détecteur matriciel en vue de la détection de la luminescence bactérienne,
- un contrôleur Peltier AMS Technologies avec port RS232 qui aura pour fonction la régulation thermique uniforme de la carte MBC (typiquement 25°C à 35°C),
- une électrovanne multiposition VICI Valco C45 6×1 pour la fluidique avec port RS232 qui aura pour fonction la sélection des échantillons vers la carte,
- une pompe péristaltique 8 galets type Meredos TL avec port RS232 qui assurera la circulation des fluides dans l'ensemble du système; la circulation des fluides dans la carte devra être uniforme sur toute la carte MBC afin de travailler dans de bonnes conditions biologiques,
- un porte échantillon composé de 4 flacons dans lesquels seront placés les composés biologiques à tester,
- un ordinateur pour l'acquisition des signaux, leur traitement, et la gestion de l'ensemble des paramètres de Lumisens II (allumer/éteindre le module Peltier, définir la température cible du module Peltier, afficher sa température courante, commander l'électrovanne dans le cadre d'un protocole mono-action ou périodique, afficher l'état de l'électrovanne, commander la pompe péristaltique : débit périodique, calibrage, affichage, déterminer des paramètres statistiques sur les mesures de la carte MBC).

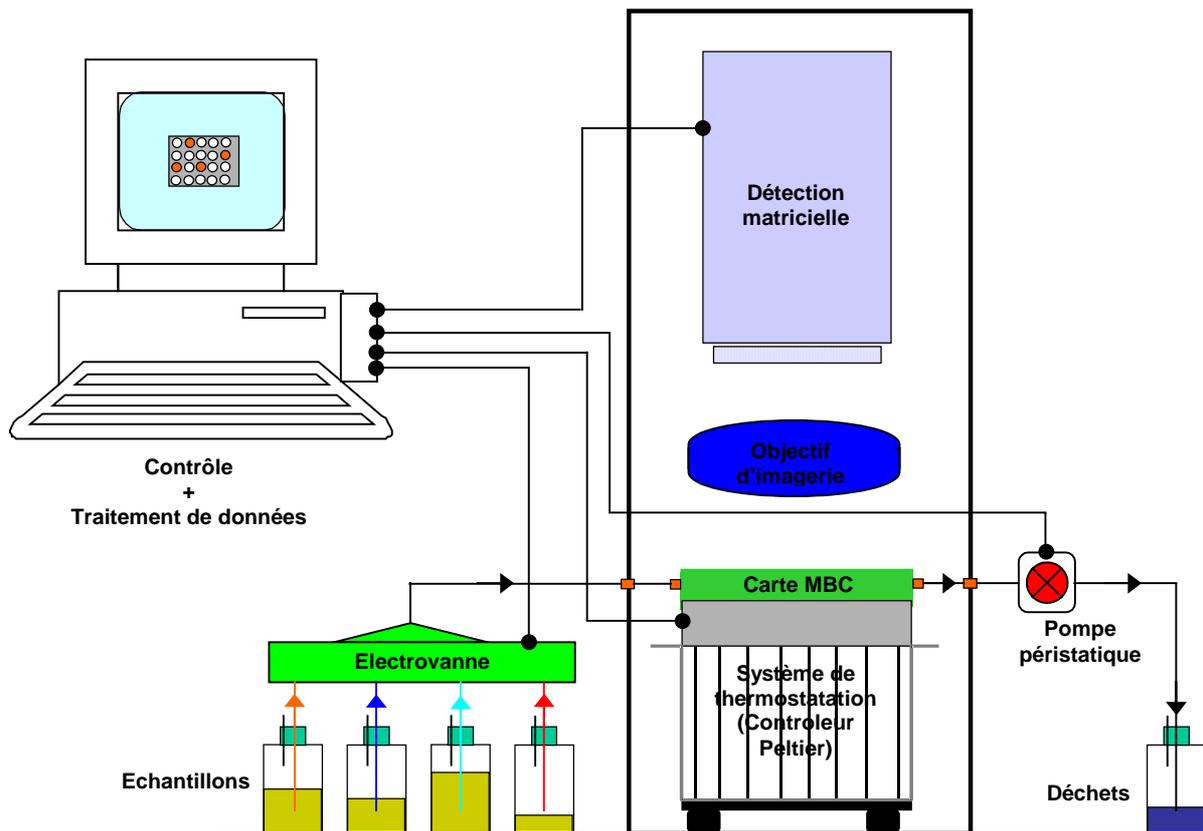


Figure 3.1 : Prototype Lumisens II

L'ensemble détecteur-objectif-MBC-peltier doit être étanche à la lumière extérieure. La solution mécanique pour caréner l'ensemble et assurer l'insertion/retrait de la carte MBC de l'enceinte a été conçue en tenant compte des besoins en microfluidique pour l'alimentation des bactéries. Le positionnement de la carte MBC sera parfaitement reproductible avec une tolérance de $\pm 0,1\text{mm}$ de sorte que la zone vue par le détecteur est invariante. Cette invariabilité permet l'application systématique de masques binaires sur les zones d'intérêt. Le contrôle de ces différents éléments est réalisé par la même interface développée en C/C++ sous Microsoft Visual C. Les fluides ayant traversés l'ensemble sont dirigés vers un récipient poubelle qui sera ensuite autoclavé.

La figure 3.2 représente schématiquement le principe de formation des images multicanales avec Lumisens II.

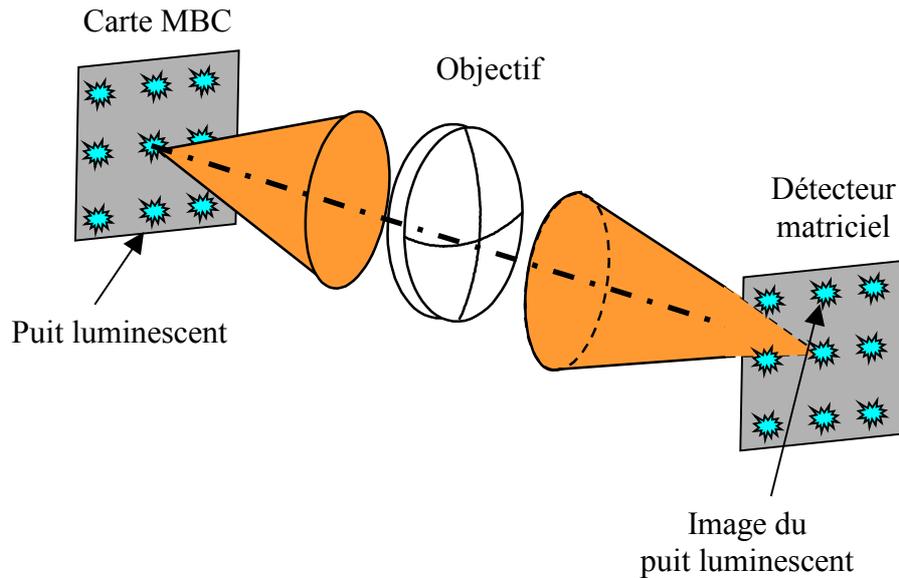


Figure 3.2 : Dispositif d'acquisition d'image par un détecteur matriciel

La carte MBC est imagée sur la matrice de détecteurs via un objectif. L'image de l'ensemble de la carte MBC est formée instantanément sans balayage. L'information sur la luminescence de chaque puit de la carte est obtenue en une seule acquisition. Si les puits sont remplis de bactéries sensibles à différentes substances toxiques, alors le biocapteur est multicanal en ce sens qu'une seule préparation donne accès à un large panel de sensibilités.

Dans cette conception d'ensemble où s'associent plusieurs compétences, ce travail de thèse est intervenu en amont du système développé dans sa totalité. En effet, nous avons eu la responsabilité de définir le type de détecteur et de sélectionner le matériau et la taille des puits de la carte MBC. La plupart des expériences présentées ci-dessous ont été réalisées lors de plusieurs déplacements à l'IUT de La Roche sur Yon. Les paragraphes suivants décrivent ainsi la démarche suivie pour optimiser le choix des composants de Lumisens II.

2. Choix du détecteur

Dans des applications où le niveau de lumière à détecter est faible, les photodétecteurs les plus utilisés sont les photomultiplicateurs et les photodiodes à avalanches[2]. En effet, ils sont très sensibles pour la détection des flux lumineux faibles comme dans le cas de la bioluminescence bactérienne. C'est ce type de détecteur qui a été mis en œuvre dans Lumisens I. Cependant, ces détecteurs sont utilisés généralement pour une mesure ponctuelle, c'est à dire en un seul point. Ils sont les plus sensibles dans le visible mais fragiles, délicats à manipuler en cas d'une détection multicanale et nécessitent une haute tension de polarisation. En comparaison, les détecteurs matriciels tels que caméras CCD et CMOS ont une sensibilité moyenne par rapport aux photomultiplicateurs. Elles sont utilisées pour une mesure simultanée en plusieurs points et elles donnent des informations spatiales.

Pour la détection des signaux lumineux faibles, le refroidissement des caméras devient nécessaire afin de minimiser le bruit thermique. Si on suppose que la carte MBC, dans sa version finale, contiendra 64 puits alors il faudra une matrice de détecteurs à 64 photo-éléments. En conséquence, il est donc unimaginable d'utiliser 64 photomultiplicateurs du type de celui utilisé dans Lumisens I, d'une part en raison du coût, et d'autre part en raison des

difficultés technologiques que l'on rencontrera pour réaliser un tel détecteur matriciel. Par ailleurs, il est exclu d'utiliser un unique détecteur couplé à un système de balayage en raison d'une part de la complexité technique et de l'absence de compacité du biocapteur et d'autre part du temps qu'il faudra pour balayer les 64 puits. Le choix du détecteur matriciel se porte donc naturellement vers une caméra de type CCD (Charge Coupled Device) ou CMOS (Complementary Metal Oxyde Semiconductor).

Le bruit du détecteur est une caractéristique importante à prendre en compte car d'une manière générale, le bruit limite la détectivité du système, c'est-à-dire, en terme simple, sa capacité à détecter des objets de faible intensité lumineuse[2]. Cependant, il ne faut pas s'arrêter à ce paramètre pour juger de la performance finale d'une caméra. Par exemple, le rendement quantique η_λ est déterminant pour évaluer la sensibilité finale du système. Dans la plupart des caméras à base de silicium, ce taux est de l'ordre de 30% à 70% ; il est cependant très variable en fonction de la longueur d'onde et pour le pic de luminescence observé avec les gènes *luxAB*, l'efficacité quantique est de l'ordre de 40%. La linéarité de la réponse, qui est la proportionnalité entre le nombre de photons incidents et le signal observé à la sortie du CCD, est d'une manière générale excellente avec les caméra actuelles. Le bruit thermique du capteur est la manifestation de charges parasites qui sont produites du fait de l'agitation thermique du réseau cristallin de silicium. Même si le détecteur est plongé dans l'obscurité, le signal thermique se manifeste toujours et produit un signal électrique parasite perceptible. Les charges thermiques sont produites avec un taux qui est proportionnel au temps d'intégration. Sans précaution particulière, le signal thermique peut dominer le signal utile optique, ce dernier étant alors susceptible de devenir inexploitable. La seule solution pour éliminer ce bruit thermique parasite consiste à refroidir le détecteur lors de son utilisation.

Depuis leur développement au début des années 1970, les capteurs d'images CCD ont connu un large succès dans de nombreux secteurs scientifiques et techniques. Les capteurs CMOS sont apparus dans les années 80. Le coût de fabrication d'une plaquette CMOS est le tiers de celui d'une plaquette équivalente avec des dispositifs CCD. Cependant, un CMOS a une sensibilité moins grande que celle d'un capteur CCD et sa résolution est nettement inférieure de fait que le processeur est intégré directement au pixel. Le facteur de remplissage de la matrice peut être voisin de 1 pour un CCD alors qu'il n'atteint pas 50% pour un CMOS. Compte tenu que l'on souhaite avoir une sensibilité optimale et un maximum de pixels pour échantillonner chaque puit de la carte MBC et que nous aurons certainement des temps de pose long (quelques minutes), nous avons choisi une technologie CCD refroidie par effet Peltier.

Ainsi, le logiciel développé pour le contrôle de tous les éléments du prototype permettra également de définir les paramètres du détecteur :

- définir le temps de pose de la caméra
- afficher une image en noir et blanc ou en fausses couleurs
- charger/sauvegarder une image
- appliquer des filtrages d'image de type lissage, contour, non linéaire, etc...
- présenter des histogrammes
- sélectionner des zones d'intérêt sur l'image

Dans le paragraphe suivant, nous présentons notre étude photométrique du capteur.

3. Photométrie du capteur

Le dimensionnement du détecteur doit être effectué en menant une étude photométrique de façon à estimer les flux, les éclairements et ainsi les temps de pose. La figure 3.3 représente un schéma de principe de la relation objet-image dans le système. Chaque puit a une surface ΔS et une luminance L_{IM} que nous supposons uniforme.

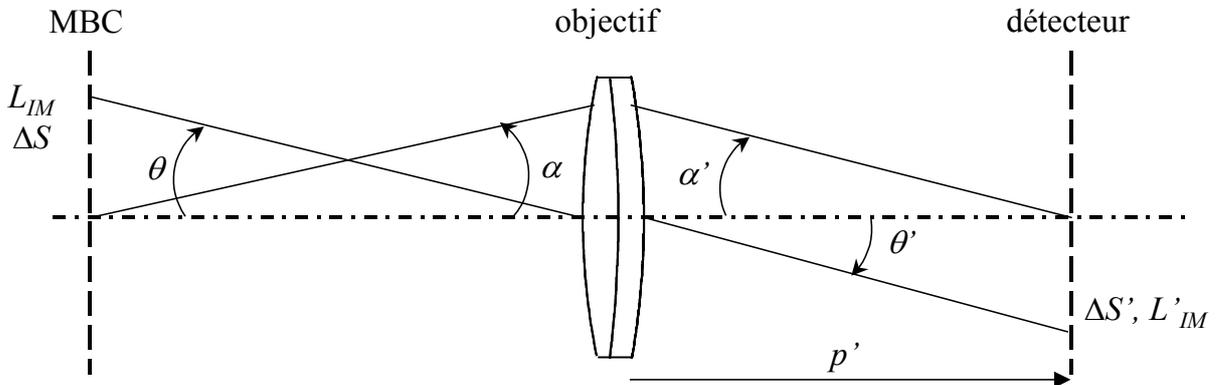


Figure 3.3 : Relation objet-image

On considère θ et θ' les angles de champ pour un puit de la carte MBC, α , α' les angles d'ouverture de l'objectif dont le facteur de transmission est τ , p' la position de la matrice de détecteurs par rapport à l'objectif. Le flux lumineux sortant de l'objectif est donné par l'équation suivante[3]

$$\Phi_r = \pi \tau L_{IM} \Delta S' \sin^2 \alpha' \quad (3.1)$$

Comme

$$\sin \alpha' \cong \frac{R}{p'} = \frac{R}{f'} \frac{1}{(1-g_y)} = \frac{1}{2N} \frac{1}{(1-g_y)} \quad (3.2)$$

où $N = f'/2R$ est le nombre d'ouverture de l'objectif, R étant le demi diamètre de son diaphragme d'ouverture, et g_y est le grandissement transversal entre le plan de la carte MBC et le plan de la matrice de détecteurs. Le grandissement transversal est négatif dans ce type de conjugaison. L'éclairement dans le plan image est donc

$$E_0 = \frac{\Phi_r}{\Delta S'} = \frac{\pi \tau L_{IM}}{4N^2} \frac{1}{(1-g_y)^2} \quad (3.3)$$

Lorsque le puit n'est pas sur l'axe du système mais qu'il est vu sous l'angle θ' , l'éclairement reçu par le détecteur devient[3]

$$E_\theta = E_0 \cos^4 \theta' = \frac{\pi \tau L_{IM}}{4N^2} \frac{\cos^4 \theta'}{(1-g_y)^2} \quad (3.4)$$

Pour un pixel de surface S_d , le nombre de photoélectrons générés par le flux incident pendant une durée t_p , pour la longueur d'onde λ , est donné par

$$N_{e^-} = \frac{\eta_\lambda \lambda}{hc} E_\theta S_d t_p = \frac{\eta_\lambda \lambda}{hc} \frac{\pi \tau L_{IM} S_d t_p}{4N^2} \frac{\cos^4 \theta'}{(1-g_y)^2} \quad (3.5)$$

où η_λ est l'efficacité quantique à la longueur d'onde λ . Afin d'éviter la saturation du détecteur, le nombre d'électrons N_{e-} doit être inférieur au nombre maximal d'électrons N_{e-sat} que le photodétecteur peut générer :

$$N_{e-} \leq N_{e-sat} \quad (3.6)$$

La durée d'exposition maximale est donc donnée par la relation suivante

$$t_p^{\max} \leq \frac{4hcN_{e-sat} N^2 (1-g_y)^2}{\pi\eta_\lambda \lambda \tau L_{IM} S_d \cos^4 \theta'} \quad (3.7)$$

Le temps d'exposition maximal entraînant la saturation sera obtenu pour le bord du champ de mesure. Cependant, l'éclairement étant supérieur au centre de champ, la saturation interviendra au centre plus vite qu'au bord. Il convient donc de s'assurer que l'étendue du champ de mesure n'entraîne pas une variation trop grande du $\cos^4 \theta'$. Ainsi, à une exposition donnée, le nombre de photoélectrons générés restera invariant dans le champ de mesure.

Pour une exposition donnée t_p , le rapport signal sur bruit (*RSB*) s'exprime par

$$RSB = \frac{N_{e-utile}^2}{N_{e-bruit}^2} = \frac{N_{e-utile}^2}{N_{e-photon}^2 + N_{e-lecture}^2 + N_{e-obs}^2} \quad (3.8)$$

où $N_{e-utile}$, $N_{e-photon}$, $N_{e-lecture}$ et N_{e-obs} sont respectivement le nombre de photoélectrons générés par le signal utile de luminescence, le bruit de photon, le bruit de lecture du détecteur et le nombre d'électron généré en obscurité du détecteur. Comme nous avons

$$N_{e-photon} = \sqrt{N_{e-utile}} \quad (3.9)$$

et

$$N_{e-obs} = n_{e-obs} \times t_p \quad (3.10)$$

avec n_{e-obs} représente le taux de comptage.

Il vient donc pour le *RSB* maximum à la saturation :

$$RSB_{\max} = \frac{\pi^2 \eta_\lambda^2 \lambda^2 \tau^2 L_{IM}^2 S_d^2 \cos^8 \theta' (t_p^{\max})^2}{16h^2 c^2 N^4 (1-g_y)^4 (N_{e-sat} + N_{e-lecture}^2 + n_{e-obs}^2 (t_p^{\max})^2)} \quad (3.11)$$

Le rapport signal sur bruit est donc donné en fonction de la luminance des puits, de la surface d'un pixel, du temps d'exposition et du nombre d'ouverture de l'objectif.

4. Choix de la caméra

Le choix de la caméra doit s'effectuer en tenant compte du temps d'exposition et du rapport signal sur bruit. D'après les équations 3.7 et 3.11, il est nécessaire de connaître la luminance d'un puit pour déterminer le temps d'exposition et le *RSB*. Les résultats expérimentaux du Chapitre II ont montré que la luminance des bactéries en phase liquide est de l'ordre de $L_{CM} = 6 \times 10^{-5} \text{ W.sr}^{-1}.\text{m}^{-2}$.

Des essais préliminaires en phase immobilisée ont montré que la luminance était beaucoup plus faible qu'en phase liquide, l'ordre de grandeur étant 5.

Nous avons donc choisi pour les évaluations numériques une luminance des puits de l'ordre de $L_{IM} = L_{CM}/5 = 1,2 \times 10^{-5} \text{ W.sr}^{-1}.\text{m}^{-2}$ et une longueur d'onde de 500 nm. Par ailleurs, le facteur de transmission d'un objectif traité antireflet avoisine les 95%. Nous avons donc choisi $\tau = 0,95$ et nous avons fixé le nombre d'ouverture à 2,8, ce qui correspond aux caractéristiques d'un objectif commercial. Le grandissement transversal est calculé en fonction de la taille de la carte MBC et de la largeur de la matrice de pixels compte tenu que l'on cherchera à ce que l'image de la carte couvre au mieux la matrice. Nous avons pris une

largeur de carte MBC égale à 68 mm. Les paramètres évalués seront donc : temps d'exposition maximum (t_p^{max}), éclairement au centre du champ (E_0 à $\theta' = 0$) et rapport signal sur bruit maximum (RSB_{max}).

Après une étude de marché d'un certain nombre de caméras et selon leurs caractéristiques techniques, nous avons estimé ces paramètres. Nous avons sélectionné des caméras CCD refroidies qui peuvent répondre à notre application[4,5,6,7].

Le tableau 1 donne les caractéristiques techniques des caméras sélectionnées et les résultats des estimations numériques. A partir des évaluations présentées dans ce tableau, nous avons retenu le modèle RTSE6 proposé par BFI Optilas[6]. En effet, les évaluations montrent un temps d'exposition maximum inférieur aux autres modèles (6,5 min) et un excellent rapport signal sur bruit de 29 dB. Par ailleurs, c'est un produit extrêmement compétitif au niveau du coût total (caméra, carte d'acquisition, logiciel, bibliothèque C/C++). Ce qui constitue un paramètre d'importance dans l'esprit d'un futur développement commercial.

5. Carte Mini-Bio-Chip (MBC)

Pour le choix du matériau et le dimensionnement des puits de la carte MBC, nous avons travaillé avec trois types de matériaux : ertacétal noir, téflon blanc et plexiglas transparent. Dans la suite, nous appelons carte noire, carte blanche et carte transparente, respectivement, une carte fabriquée à partir de l'ertacétal noir, du téflon blanc ou du plexiglas transparent. La figure 3.4 représente un schéma de la carte MBC que nous avons utilisée pour effectuer nos premiers essais. Chaque carte est constituée de 24 puits. Les puits sont de diamètres variables de 2,3,4,5,6,7,8 et 9 mm pour une épaisseur de 5 mm. Pour chaque diamètre, on a trois puits identiques : un puit comme témoin et les deux autres pour les tests.

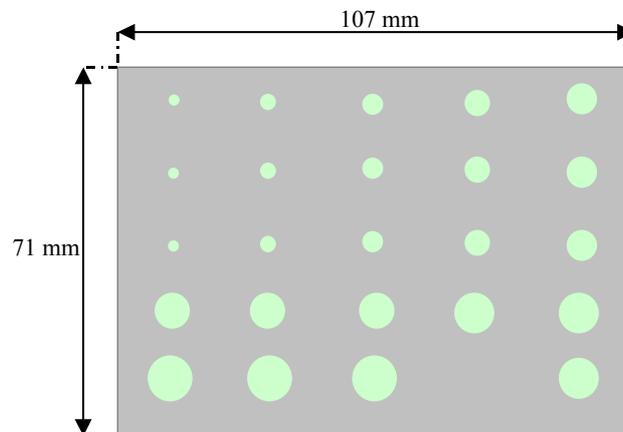


Figure 3.4 : Carte test MBC en vue de dessus

Pour tester le matériau, nous avons travaillé avec des bactéries non induites par le TBT en phase liquide. La suspension bactérienne est prélevée directement de la culture en continu du réacteur de Lumisens I. La culture en continu assure une activité constante des bactéries tout au long des expériences. La mesure de bioluminescence est effectuée uniquement en présence de décanal avec la caméra RTSE6. Le volume de TBT3 ajouté dans chaque puit (V_{TBT3}), ainsi que le volume de décanal sont calculés de façon à obtenir une épaisseur uniforme dans tous les puits (5mm). Le décanal est utilisé avec une concentration de 30 μM . La concentration initiale du décanal étant de 210 μM , le volume ajouté en décanal est $V_{décanal} = 30V_{TBT3}/210$. La solution de décanal est obtenue à partir de l'eau distillée, de l'isopropanol et du décanal pur avec des concentrations bien choisies.

	Hamamatsu			Photonlines	BFI Optilas			Roper Scientific	
	ORCA2ERG	ORCA2BT	C4742	Sensicam qe	RETIGAEXI	RTSE6	STSE6 mono	VersarrayXp1K	VersarrayXp1KB
η_λ (%)	35	40	40	30	40	40	30	20	40
N_{e-sat} électrons	18500	230000	230000	18000	18000	14800	14800	100000	100000
Taille pixel (μm^2)	6,45×6,45	24×24	24×24	6,45×6,45	6,45×6,45	6,45×6,45	6,45×6,45	13×13	13×13
$N_{e-lecture}$ électrons (rms)	4	8	8	5	8	7	7	2	2
n_{e-obs} électrons/s	0,0045	0,8	0,3	inconnu	0,15	0,012	0,012	0,001	0,001
t_p possible (s)	10 μs – 2min	20min maximum	20min maximum	0,5 μs – 16min	40 μs – 18min	40 μs – 70min	40 μs – 70min	inconnu	inconnu
Refroidissement	-60°C (peltier)	-70°C (liquide)	aucun	-12°C (peltier)	aucun	-28°C (peltier)	-48° (peltier)	-65°C (peltier)	-65° (peltier)
Surface active (mm^2)	8,67×8,67	12,29×12,29	8,67×6,70	8,87×6,70	8,77×6,68	8,77×6,68	8,77×6,68	13,3×13,3	13,3×13,3
t_p^{\max} (min)	9,37	8,07	7,36	10,69	8,00	6,58	8,77	24,54	12,27
RSB_{\max} (dB)	30,6	36,0	40,4	inconnu	27,1	29,6	29,6	37,9	37,9
E_0 ($\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$)	2×10^{-8}	$1,83\times 10^{-8}$	2×10^{-8}	$1,99\times 10^{-8}$	2×10^{-8}	2×10^{-8}	2×10^{-8}	$1,78\times 10^{-8}$	$1,78\times 10^{-8}$

Tableau 1 : Comparaison des caméras CCD

La figure 3.5 représente respectivement les images obtenues avec les cartes blanche, noire et transparente pour un temps de pose de l'ordre de 5 min. Toutes les images sont effectuées dans les mêmes conditions expérimentales. Les expériences ont été répétées 3 fois. A partir de ces images, nous constatons que la carte blanche donne naissance à une diffusion de la lumière, émise dans les puits, autour de ces puits.

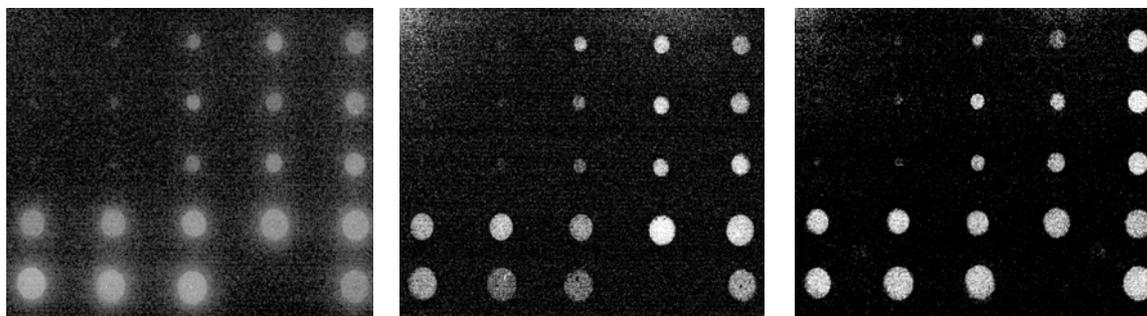


Figure 3.5 : Images des cartes blanche (G), noire et transparente (D), 5 min d'exposition

Le meilleur contraste sur les images est obtenu avec la carte transparente placée sur un fond noir et c'est ce matériau qui a été retenu. On constate également que les évaluations photométriques sont conformes aux expériences puisque le temps de pose a été estimé à 6,5 min et que celui des acquisitions est de 5 min.

6. Immobilisation

Le choix de la matrice d'immobilisation doit être effectué en fonction de l'activité bactérienne dans le gel immobilisant et des propriétés d'absorption et de conservation du gel. La définition de ce paramètre sort du cadre de cette thèse. Cependant, on reporte ici les principaux résultats obtenus pendant la thèse de M. Perneti qui a travaillé au choix du matériau à l'ENITIAA de Nantes dans l'équipe du Professeur D. Poncelet (thèse en co-tutelle Université de Nantes/Université de Rome). Les propriétés rhéologiques, mécaniques et optiques, la stabilité du stockage, les phénomènes de transport de masse et la biocompatibilité ont été évalués[8]. Les matériaux possibles sont l'agarose, l'alginate, le polyvinyl alcool et le silicone. L'agarose a été choisi comme modèle car il montre une biocompatibilité très élevée, une excellente transparence et une gélification thermique simple. Les travaux ont montré que la meilleure concentration d'agarose est 2%, donnant des transmissions de 99,95% dans la bande 490-510nm.

Dans tout ce qui suit, les protocoles de préparation du gel sont issus des travaux de M. Perneti[8].

Le paragraphe suivant présente les tests de validation qui confirment la viabilité de Lumisens II.

III. Tests de validation

1. Objectifs

Après avoir effectué les choix pertinents pour les composants de Lumisens II, nous avons validé le principe de mesure avec un dispositif qui est sensé modéliser le prototype final décrit sur la figure 3.1. En particulier, nous avons utilisé la bactérie TBT3 immobilisée dans l'agarose et induite par le TBT. La caméra est le modèle RTSE6 de BFI Optilas et le modèle de carte correspond à celui de la figure 3.4.

2. Préparation des bactéries

Nous avons travaillé avec la bactérie *Escherichia coli* TBT3 sensible à la présence de TBT. Le milieu de culture est le milieu glucose à pH = 7. La préparation de ce milieu est conforme à celle décrite dans la publication de l'équipe de l'IUT de La Roche sur Yon[9].

La culture de TBT3 est effectuée en continu dans un bioréacteur avec un volume total de 100 mL, sous agitation et à une température de 30 °C, jusqu'à atteindre l'équilibre dynamique. La densité cellulaire est ensuite maintenue constante à DO = 0,3.

3. Protocole de mesure

Les essais sont effectués avec des bactéries immobilisées dans l'agarose Lowpoint à 2%. Dans l'ensemble des expériences, la mesure de bioluminescence par la caméra CCD est effectuée en deux étapes :

- acquisition d'une première image de la carte sans présence de décanal ; cette image donne le bruit de fond du système d'acquisition,
- acquisition d'une seconde image après avoir ajouté du décanal.

Pour obtenir l'image utile, il faut soustraire l'image de fond de cette seconde image.

4. TBT3 en phase immobilisée induite par le TBT

En phase immobilisée, les bactéries émettent moins de lumière. Le temps d'induction dure deux heures à une température de 30 °C. La préparation des bactéries et du gel d'immobilisation est effectuée selon ce protocole :

- Préparation de TBT3 à DO = 0,6

On prélève 6 mL de la suspension bactérienne de la culture en continu, on centrifuge pendant 10 minutes à 4000g ensuite on ajoute 3 mL de milieu glucose. On obtient une suspension avec une DO de 0,6 qui sert de base à la préparation des autres DO.

- Préparation de l'agarose à 2%

Dans 10 mL d'eau distillée, on ajoute 0,2 g d'agarose, on chauffe sous agitation jusqu'à obtenir un milieu homogène et transparent ce qui correspond à la dissolution complète de l'agarose. Ensuite, on ajoute 3 mL d'agarose à 40°C à 3 mL de suspension bactérienne et on obtient ainsi une préparation avec une DO de 0,3 (solution A).

Pour une série de puits de même diamètre, un des puits servira de témoin et les deux autres serviront de tests (figure 3.6).

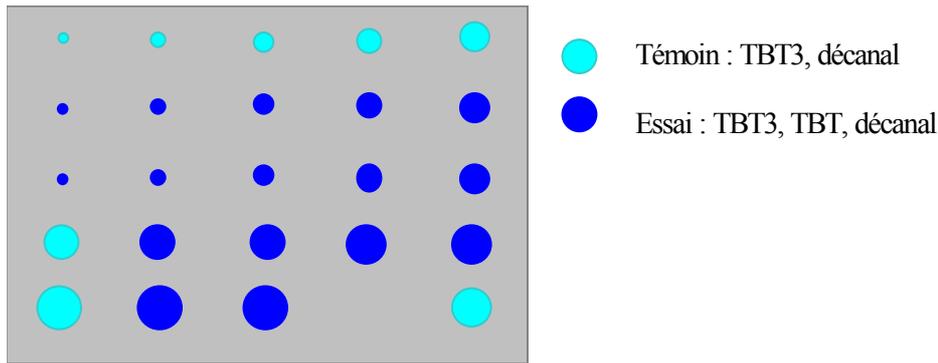


Figure 3.6 : Schéma de remplissage des puits

Dans chaque puit de la carte, on dépose le volume nécessaire de TBT3 avec de l'agarose (solution A). Après 15 minutes, temps de solidification du gel, on ajoute dans le puit témoin de l'eau de mer pour un volume égal à $V_{TBT3}/2$. Pour les puits tests, on ajoute la solution de TBT à $3\mu\text{M}$ pour un volume égal à $V_{TBT3}/2$. Le temps d'incubation est de deux heures à une température de 30°C .

La figure 3.7 montre le résultat obtenu pour un temps d'exposition de 10 min et un binning 2×2 des pixels.

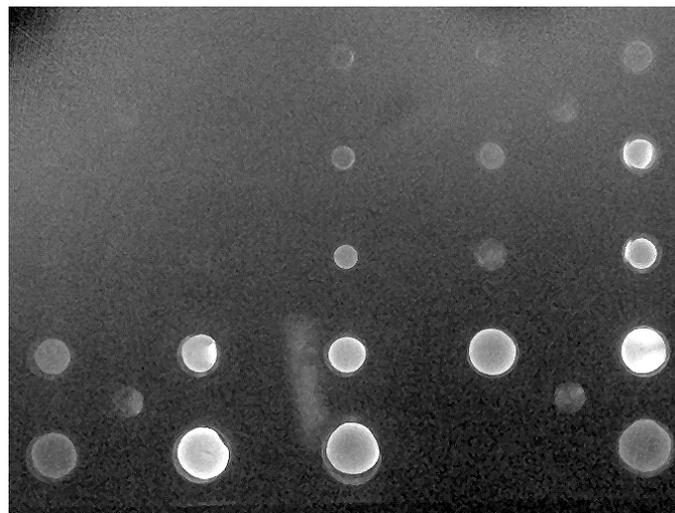


Figure 3.7 : Image obtenue avec la carte transparente

Sur la figure 3.7, pour les puits témoins, nous avons un niveau de lumière moins intense en comparaison du niveau de lumière émis dans les puits essais. On constate aussi la présence d'une inhomogénéité dans les différents puits. Sur les bords des puits on trouve un niveau de luminescence plus élevé par rapport au centre (plus d'oxygène sur les bords). Cette différence s'explique par le fait que les bactéries ont tendance à fuir vers les bords des puits, certainement en raison d'un gradient de tension superficielle. Avec des puits de diamètre de 2 mm, aucun résultat n'est obtenu. Pour les puits de diamètre 3 mm, le niveau de luminescence est proche du bruit de fond et on obtient un mauvais contraste. Compte tenu de ces résultats, le diamètre minimum retenu pour un puit sera de 4 mm.

5. Effet de la concentration cellulaire

Nous avons évalué l'effet de la concentration cellulaire sur la mesure de bioluminescence en phase immobilisée dans les puits. Nous avons choisi des DO de 0,05, 0,15 et 0,3. Le protocole de préparation des bactéries est le suivant :

- Préparation de l'agarose à 2%

Dans 10 mL d'eau distillée, on ajoute 0,2 g d'agarose et on chauffe jusqu'à la dissolution complète de l'agarose.

- Préparation de l'agarose à 1%

Dans 20 mL d'eau distillée, on ajoute 0,2 g d'agarose et on chauffe jusqu'à la dissolution complète de l'agarose.

- Préparation préliminaire de TBT3 à DO = 0,6 (solution 1)

On prélève 15mL de la suspension bactérienne issue de la culture en continu du réacteur, on centrifuge pendant 10 minutes à 4000g ensuite on ajoute 7,5 mL de milieu glucose. On obtient une suspension à DO = 0,6.

- Préparation de TBT3 à DO = 0,3 (solution 2)

Dans 7,5 mL de la solution 1, on ajoute 7,5 ml d'agarose à 2%.

- Préparation de TBT3 à DO = 0,15 (solution 3)

Dans 5 mL de la solution 2, on ajoute 5 ml d'agarose à 1%.

- Préparation de TBT3 à DO = 0,05 (solution 4)

Dans 2 mL de la solution 2, on ajoute 10 ml d'agarose à 1%.

Dans une série de trois puits de même diamètre de la carte, on dépose une solution de TBT3 (solution 2, 3 ou 4). Après solidification des solutions (15 minutes), on ajoute du TBT à $3\mu\text{M}$ dans tous les puits. Le temps d'incubation est fixé à deux heures à une température de 30°C . La figure 3.8 ci-dessous donne la répartition du remplissage des puits.

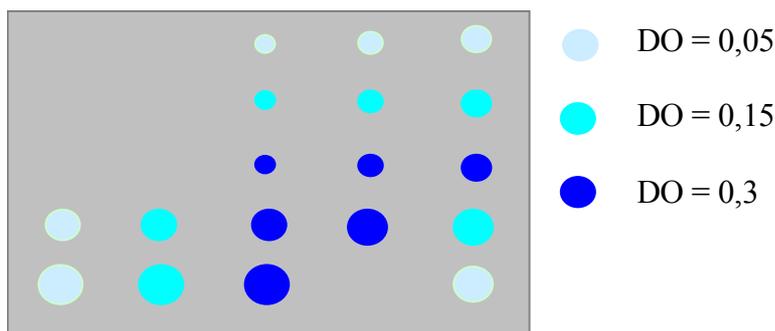


Figure 3.8 : Carte avec les trois concentrations cellulaires

La figure 3.9 montre le résultat obtenu pour un temps d'exposition de 10 min et un binning 2×2 des pixels.

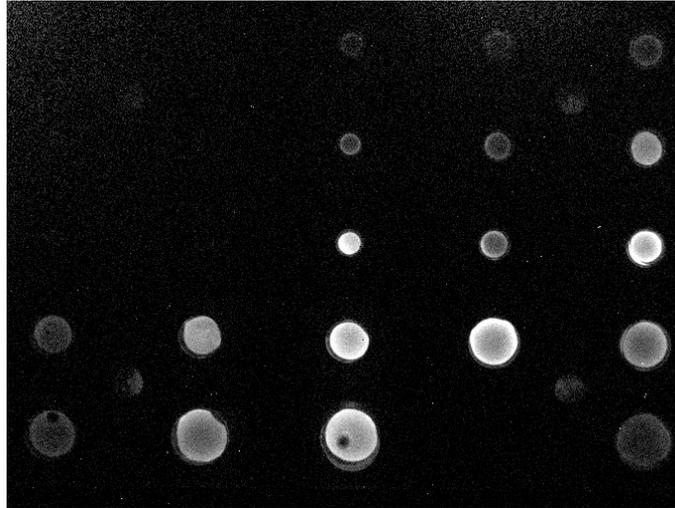


Figure 3.9 : Image de la carte avec les trois concentrations cellulaires

Sur l'image de la figure 3.9, nous remarquons que plus la densité cellulaire augmente plus le niveau de lumière détecté dans les puits est élevé. La bioluminescence augmente donc avec l'augmentation de la densité cellulaire, en conséquence nous avons choisi de travailler avec une DO de 0,3 dans le prototype Lumisens II. Comme on l'avait observé sur la figure 3.7, on note également l'existence d'une inhomogénéité entre les différents puits remplis de la même suspension bactérienne ainsi qu'entre les bords et le centre d'un même puit.

6. Conclusion

Les résultats obtenus en phase immobilisée ont montré que le concept de Lumisens II est viable et ces résultats constituent donc une première validation d'un nouveau biocapteur multicanal luminescent.

IV. Premiers essais avec Lumisens II

1. Objectif

La partie opto-mécanique finalisée de Lumisens II a été développée à l'Université du Maine par C. Chapeau, ingénieur d'étude de Biolumine SA coopérant avec P. Picart et Ph. Daniel et en collaboration avec l'IUT de La Roche sur Yon (Th. Charrier, G. Thouand). Le prototype a été développé conformément au schéma de la figure 3.1. Ce paragraphe présente les premiers résultats obtenus avec Lumisens II.

2. Carte MBC

La figure 3.10 présente le prototype de la carte qui a été dimensionnée et réalisée à l'IUT de La Roche sur Yon à partir des résultats expérimentaux des paragraphes précédents[10]. La zone thermostatée est représentée en tiret et sa surface est de $68 \times 68 \text{ mm}^2$. La carte contient 64 puits de 4 mm de diamètre. Ce choix a été guidé par les coutumes appliquées en biologie. En effet, les biologistes mesurent des échantillons en triplicata et comparent à un témoin ; pour un échantillon il est souhaitable d'avoir 4 informations, 1 témoin et 3 mesures. Si on se fixe pour objectif un biocapteur multicanal 16 voies utilisant 16 bactéries aux spécificités diverses, alors il faut 64 puits. Ce compromis correspond à ce que les biologistes estiment être un bon « screening ».

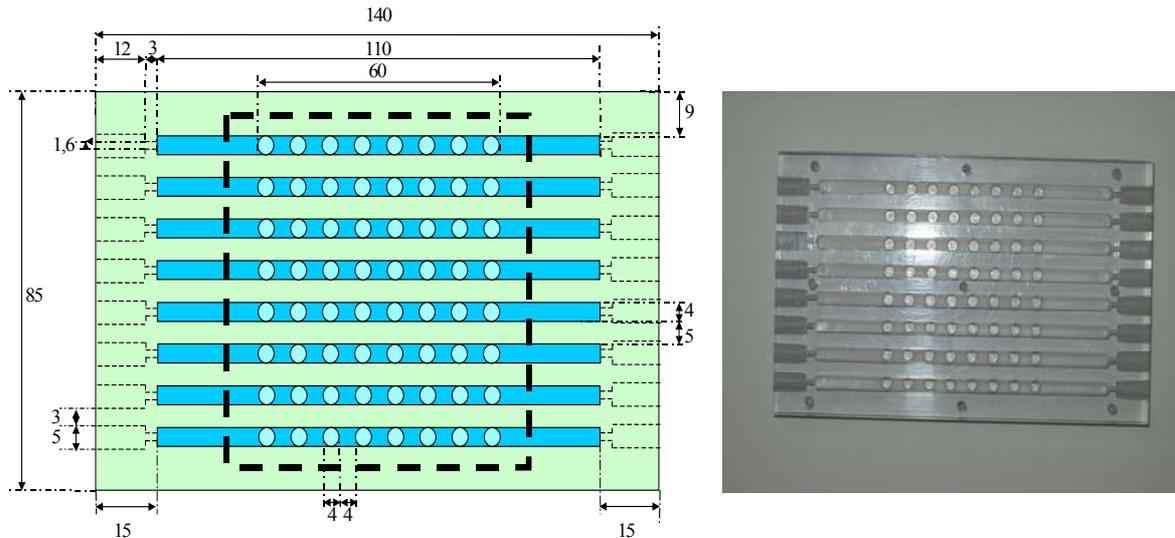


Figure 3.10 : Plan (G) et photographie (D) du prototype de carte MBC (réalisée par Th. Charrier)

La carte est traversée de gauche à droite par les fluides via les guides représentés en bleu.

3. Protocole de préparation des bactéries

Nous avons travaillé avec quatre souches bactériennes construites par Th. Charrier à l'IUT de La Roche sur Yon : la bactérie *EcoliDH1pBzntlux* sensible au cadmium, la bactérie *EcoliDH1pBARslux* sensible à la présence de l'arsenic, la bactérie *EcoliDH1pBcoplux* sensible au cuivre et la bactérie *EcoliXL1pBVfluxCDABE* qui est une bactérie constitutive qui peut émettre de la bioluminescence naturellement si les conditions de croissance sont bien maîtrisées. Ces souches sont modifiées génétiquement par introduction des gènes *luxCDABE*.

La culture des trois premières bactéries est effectuée en batch dans un milieu de culture appelé acétate. La bactérie *EcoliXL1pBVfluxCDABE* est cultivée dans le milieu LB, car c'est le milieu le plus convenable pour obtenir une meilleure émission de la bioluminescence.

La réponse de ces souches bactériennes est en étroite liaison avec leur environnement. Une bonne et rapide induction s'obtient à une température $T = 30^{\circ}\text{C}$ et un $\text{pH} = 7$.

Nous avons travaillé avec une suspension bactérienne à densité optique constante $DO = 0,05$ à $\lambda = 620 \text{ nm}$, avec deux concentrations pour chaque polluant. Les solutions utilisées sont :

- La solution CuSO_4 pour détecter le cuivre, les deux concentrations sont $50 \mu\text{M}$ et $0,5 \text{ mM}$, en concentrations finales;
- La solution As_2O_3 pour détecter l'arsenic, les deux concentrations sont $0,5 \mu\text{M}$ et $5 \mu\text{M}$, en concentrations finales;
- La solution CdCl_2 pour détecter le cadmium, les deux concentrations sont 50 nM et 500 nM , en concentrations finales.

Etant donné que ces souches ont été développées récemment au Laboratoire de Microbiologie à l'IUT de La Roche sur Yon et que le choix de la matrice d'immobilisation pour ces souches n'est pas bien maîtrisé, nos premiers essais de validation du système final sont effectués en phase liquide. L'ajout des fluides est effectué manuellement.

La figure 3.11 montre une photographie du prototype Lumisens II dans son état d'avancement en Mai 2005.

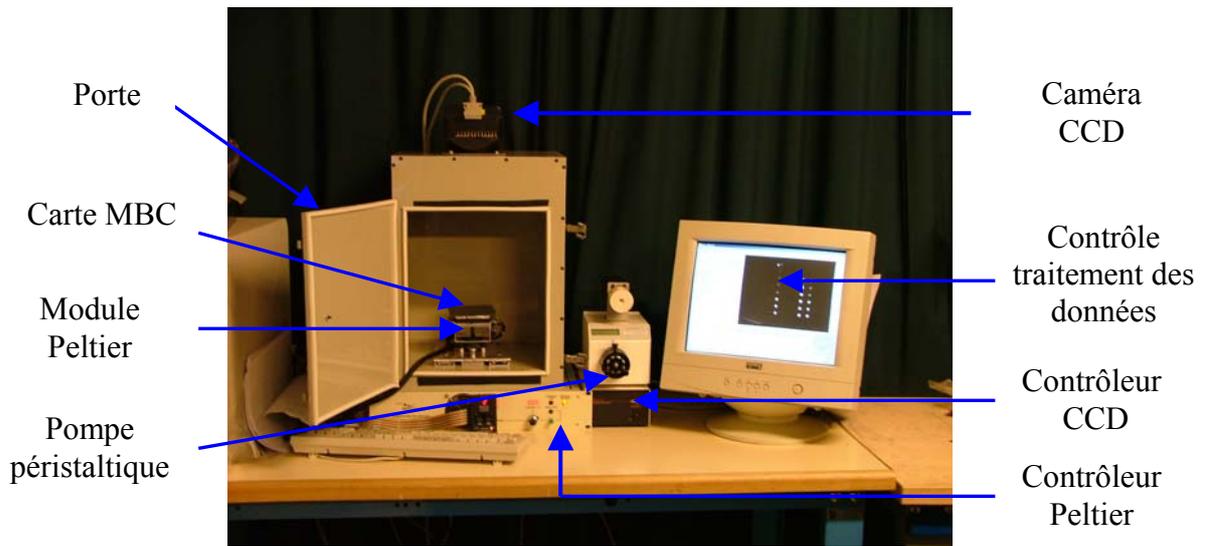


Figure 3.11 : Biocapteur Lumisens II et son environnement

4. Résultats expérimentaux

4.1. Préparation de la carte MBC

La figure 3.12 montre la répartition pour le remplissage des puits.

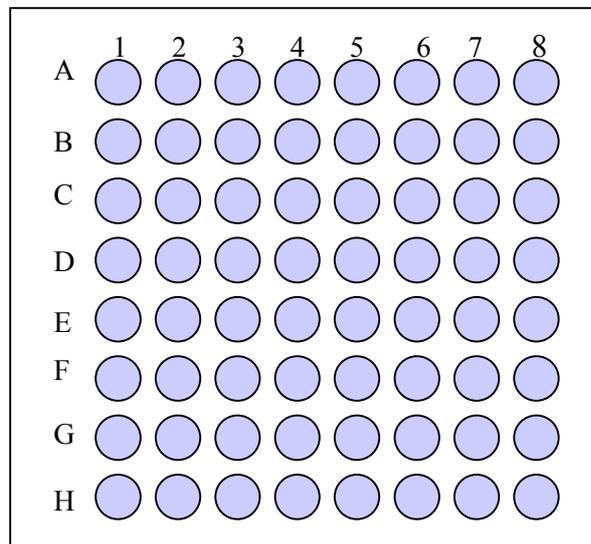


Figure 3.12 : Schéma de remplissage des puits

Le remplissage des puits en bactéries est effectué comme indiqué sur le tableau suivant :

N° de colonne	Bactérie
1	<i>EcoliXL1pBVfluxCDABE</i>
2	<i>EcoliDH1pBcoplux</i>
3	<i>EcoliDH1pBARslux</i>
4	<i>EcoliDH1pBzntlux</i>
5	<i>EcoliXL1pBVfluxCDABE</i>
6	<i>EcoliDH1pBcoplux</i>
7	<i>EcoliDH1pBARslux</i>
8	<i>EcoliDH1pBzntlux</i>

Tableau 2 : Type de bactéries ajoutées dans chaque puit

Les concentrations sont données dans le tableau 3 suivant :

	Colonne 1	2	3	4	5	6	7	8
Ligne A	témoin	témoin	témoin	témoin	témoin	témoin	témoin	témoin
B	témoin	témoin	témoin	témoin	témoin	témoin	témoin	témoin
C	50 nM CdCl ₂	50 µM CuSO ₄	0,5 µM As ₂ O ₃	50 nM CdCl ₂				
D	50 nM CdCl ₂	50 nM CdCl ₂	50 nM CdCl ₂	50 nM CdCl ₂	0,5 µM As ₂ O ₃	50 µM CuSO ₄	0,5 µM As ₂ O ₃	50 nM CdCl ₂
E	50 nM CdCl ₂	50 nM CdCl ₂	50 nM CdCl ₂	50 nM CdCl ₂	50 µM CuSO ₄	50 µM CuSO ₄	0,5 µM As ₂ O ₃	50 nM CdCl ₂
F	500 nM CdCl ₂	0,5 mM CuSO ₄	5 µM As ₂ O ₃	500 nM CdCl ₂				
G	500 nM CdCl ₂	500 nM CdCl ₂	500 nM CdCl ₂	500 nM CdCl ₂	5 µM As ₂ O ₃	0,5 mM CuSO ₄	5 µM As ₂ O ₃	500 nM CdCl ₂
H	500 nM CdCl ₂	500 nM CdCl ₂	500 nM CdCl ₂	500 nM CdCl ₂	0,5 mM CuSO ₄	0,5 mM CuSO ₄	5 µM As ₂ O ₃	500 nM CdCl ₂

Tableau 3 : Concentrations des solutions ajoutées dans chaque puit

Les deux premières lignes (A et B) de la carte MBC représentent le témoin, elles contiennent seulement la suspension bactérienne avec l'eau distillée (40 µL de la suspension bactérienne et 10 µL d'eau distillée).

Pour les autres puits, on ajoute 40 µL de la suspension bactérienne et 10 µL de la solution à tester.

4.2. Résultats

A partir du logiciel qui a été développé, nous avons effectué une série d'images, une image toutes les 4 minutes, pendant 97 minutes afin de suivre l'évolution de la bioluminescence émise au cours du temps et déterminer le temps minimal d'induction de chaque bactérie. L'acquisition de chaque image dure 30 secondes, avec un gain maximal au niveau de la caméra CCD ($G = 16$).

La figure 3.13 donne un exemple d'image obtenue après 97 minutes d'induction.

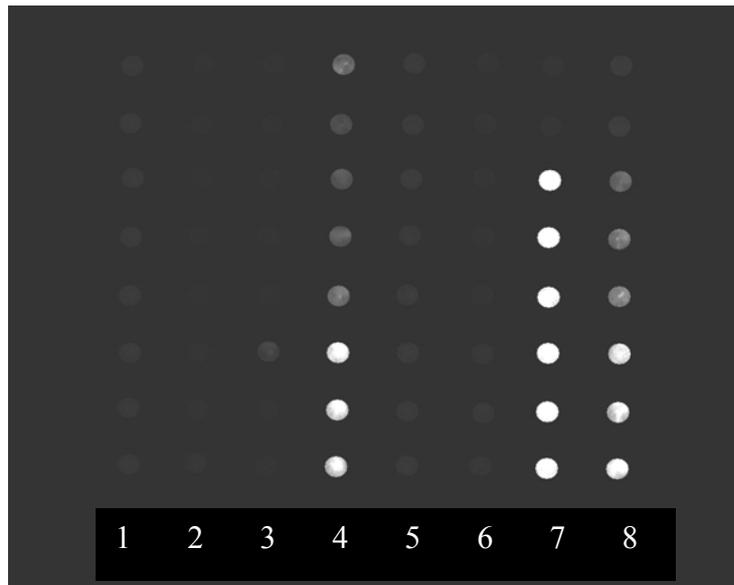


Figure 3.13 : Image de la carte MBC

Selon cette image, on obtient une réponse globale de toutes les souches avec des niveaux de bioluminescence différents en fonction du type de bactéries et les concentrations des métaux. Nous constatons que la bactérie *EcoliDH1pBcoplux* n'est pas sensible à la présence du cadmium pour les deux concentrations (50 nM et 500 nM) alors que la bactérie *EcoliDH1pBArslux* est sensible à sa présence. Ce résultat est observé pour une forte concentration en cadmium (500 nM). La bactérie constitutive *EcoliXL1pBVfluxCDABE* émet bien de la bioluminescence dans ces conditions de croissance (milieu LB, T = 30 °C, pH = 7). Pour le cas de la bactérie *EcoliDH1pBcoplux*, on note un très faible niveau de bioluminescence émise en présence du cuivre pour une forte concentration de 0,5 mM.

A partir de l'ensemble des images obtenues, nous avons tracé l'évolution de la bioluminescence en fonction du temps. Chaque point représente une moyenne sur trois puits situés dans les mêmes conditions. La figure 3.14 représente les courbes obtenues pour la détection du cadmium et l'arsenic pour deux concentrations.

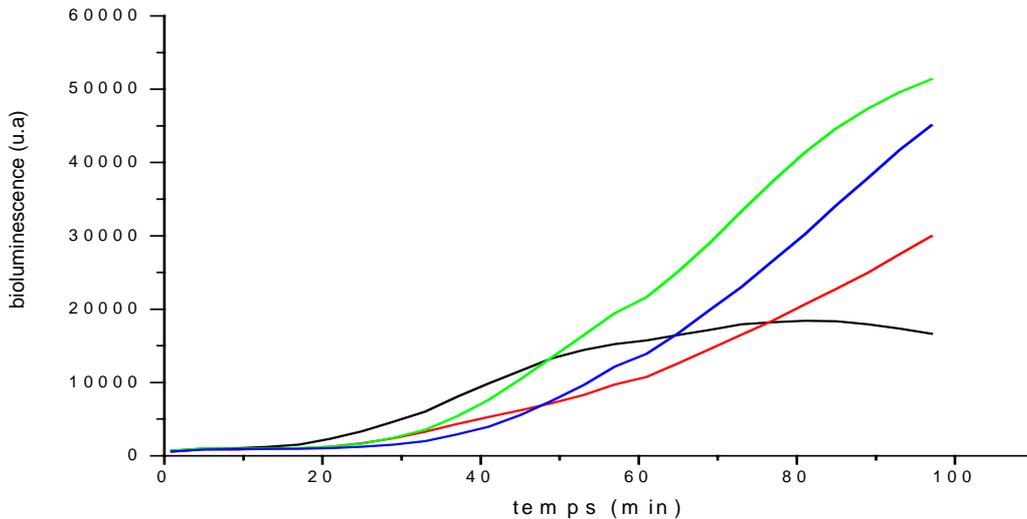


Figure 3.14 : Courbe d'évolution de la bioluminescence émise en fonction du temps

- 50 nM de CdCl_2 ajoutée à la bactérie *EcoliDH1pBzntlux*,
- 500 nM de CdCl_2 ajoutée à la bactérie *EcoliDH1pBzntlux*,
- 0,5 μM de As_2O_3 ajoutée à la bactérie *EcoliDH1pBARslux*,
- 5 μM de As_2O_3 ajoutée à la bactérie *EcoliDH1pBARslux*

D'après les courbes obtenues, nous constatons que :

- Pour la détection du cadmium, le temps minimal d'induction de la bactérie *EcoliDH1pBzntlux* est de 20 minutes pour les deux concentrations 50 nM et 500 nM. En fonction de la concentration en cadmium, la bactérie réagit différemment. En effet, pour une faible concentration, le temps de réponse est court et elle atteint un niveau de bioluminescence maximal après 80 minutes d'induction. Ensuite on note une diminution de la bioluminescence, la bactérie s'adapte à la présence du cadmium biodisponible. Cependant pour une forte concentration en métal, la bactérie met plus de temps pour atteindre un niveau d'émission maximal. Ce niveau maximal augmente avec l'augmentation de la concentration en métal. La concentration de 50 nM en cadmium est très proche de la concentration maximale autorisée dans les eaux de consommation (45 nM).
- Pour la détection de l'arsenic, comme pour le cas de la bactérie *EcoliDH1pBzntlux*, on note un temps d'induction minimal de 20 minutes pour la bactérie *EcoliDH1pBARslux*. En fonction de la concentration, la bactérie réagit toujours de la même façon avec un niveau de bioluminescence plus intense pour les faibles concentrations. En effet, les fortes concentrations en Arsenic semblent être toxiques pour la bactérie ce qui induit un niveau de bioluminescence moins intense.

4.3. Conclusion

D'après cette validation du biocapteur Lumisens II, nous avons montré la faisabilité du système de mesure pour une détection multicanale de plusieurs polluants. Nous avons trouvé qu'avec un temps de pose de 30 secondes par image, il est possible de détecter les très faibles concentrations en cadmium et arsenic avec un niveau de bioluminescence élevé et proche du

niveau de saturation de la caméra. Cependant pour le cuivre, le niveau de bioluminescence est très faible. Pour remédier à ce problème, nous envisageons d'améliorer les conditions de croissance de la bactérie *EcoliDH1pBcoplux* sensible à la présence du cuivre. Il est également possible d'augmenter la concentration en bactérie.

V. Conclusion

Nous avons présenté l'étude préliminaire à la conception d'un nouveau biocapteur bactérien luminescent en phase immobilisée. Les premiers résultats obtenus sont très encourageants. Ce système est actuellement en cours de finalisation et fera certainement l'objet d'un transfert de technologie vers la société Biolumine SA partenaire industriel du projet scientifique. Ce système constitue, à notre connaissance, le premier développement dans lequel un ensemble de bactéries est immobilisé sur une carte dédiée et jetable et dont la bioluminescence est entièrement mesurée par une caméra CCD. La réponse de ces bactéries face à un effluent constituera une empreinte de pollution.



VI. Références

1. G. Thouand, Détection simultanée de plusieurs toxiques par bioluminescence bactérienne par le concept de l’empreinte, enveloppe Soleau N°102430, 04/05/2001.
2. F. Desvignes, Détection et détecteurs de rayonnements optiques, *Editions Masson*, Paris (1987).
3. J.-L. Meyzonnette, Th. Lépine, Bases de radiométrie optiques, 2^{ème} édition, *Editions Cépadués*, Toulouse (1999).
4. www.hamamatsu.com ; documentation technique (format PDF), 2004.
5. www.photonlines.com ; documentation technique (format PDF), 2004.
6. www.bfioptilas.avnet.com ; documentation technique (format PDF), 2004.
7. www.roperscientific.com ; documentation technique (format PDF), 2004.
8. M. Perneti, D. Poncelt, G. Thouand, M.C. Annesini, C. Merli, Characterization of agarose as immobilization matrix model for a microbial biosensor, *Chemical Industry Journal*, **57** (2003) 600-604.
9. M.J. Durand, G. Thouand, T. Ivanova, P. Vachon, M.S. DuBow, Specific detection of organo-tin compounds with a recombinant luminescent bacteria, *Chemosphere*, **52** (2003) 103-111.
10. T. Charrier, G. Thouand, B. Vrignaud, J. Comiti, C. Sollicec, Carte multi-analyse polyvalente pour le contrôle simultané et en ligne des polluants dans les domaines de l’environnement, de l’agroalimentaire et de la santé, enveloppe Soleau N°222033, 07/03/2005.





Chapitre IV

Caractérisation physico-chimique par

Spectroscopie Raman





I. Introduction

Les deux chapitres précédents ont présenté des biocapteurs en phase liquide et immobilisée. Ces concepts, bien que validés expérimentalement, dépendent de l'état physiologique des bactéries bioluminescentes. Ainsi, la compréhension de la physiologie bactérienne des organismes utilisés dans le biocapteur est nécessaire. Parmi les méthodes envisageables, la spectroscopie Raman donne des informations d'ordre physico-chimique sur les molécules, groupements moléculaires et atomiques, ou encore ions présents dans les matériaux à analyser qu'ils soient à l'état gazeux, liquide ou solide.

Des travaux récents[1] ont montré que cette méthode d'étude *in-situ* non destructive est prometteuse car elle devrait permettre de rendre compte de l'état physiologique d'une cellule. En effet, cet état est étroitement lié à l'état chimique de la bactérie et il varie avec son âge et son environnement donc avec son phénotype. Ainsi, en amont des études précédentes qui ont permis de bien cerner les difficultés technologiques et biologiques, nous nous sommes orientés vers la mise au point d'une méthode de caractérisation chimique des bactéries basée sur la spectroscopie Raman.

Ce chapitre présente donc les résultats obtenus dans cette phase d'investigation. En particulier, nous avons étudié les spectres Raman pendant les trois phases de croissance pour deux bactéries (*Vibrio Harveyi* et *Bacillus Subtilis*). La détection du TBT étant un des axes de recherche du CER 2000-2006, nous avons étudié l'effet du tributylétain sur l'état physiologique de la bactérie *E.Coli. TBT3*, sensible au TBT. Dans ce contexte, nous avons également appliqué la spectroscopie Raman à l'analyse de traces de TBT dans des peintures antifouling de bateaux.

Cette section du manuscrit de thèse présente les aspects suivants :

- principe de la diffusion Raman, ses avantages et ses inconvénients,
- synthèse bibliographique sur l'utilisation de la diffusion Raman pour la caractérisation et l'identification des microorganismes,
- présentation des résultats expérimentaux obtenus lors de la caractérisation des bactéries,
- analyse de traces de TBT dans des peintures antifouling.

Il est à noter qu'une partie des résultats présentés dans ce chapitre (paragraphe IV.2.3, IV.2.4, et V.3) ont été obtenus en collaboration avec l'équipe du Professeur M. Manfait (Unité MÉDIAN, UMR CNRS 6142) de l'UFR de Pharmacie à l'Université de Reims Champagne-Ardenne.

II. Spectroscopie Raman

1. Principe et domaines d'études

L'effet Raman est basé sur les phénomènes de diffusion inélastique de la lumière. Lorsqu'une molécule est soumise à une onde électromagnétique monochromatique de fréquence ν_0 , une grande partie de la lumière incidente est diffusée sans changement de fréquence, mais une très faible partie du signal est diffusée à une fréquence différente : c'est l'effet Raman. Trois cas se présentent pour la lumière diffusée (figure 4.1) :



- Soit la majorité des photons diffusés ne subit pas de changement de fréquence : c'est la **diffusion Rayleigh**. Dans un schéma simple de répartition en niveaux d'énergie, l'atome ou la molécule appartenant à un niveau vibrationnel fondamental ($V=0$) est excitée par la radiation incidente. Il subit alors une transition jusqu'à un niveau virtuel mais revient spontanément sur son niveau d'énergie d'origine.
- Une petite partie des photons diffusés l'est à une fréquence inférieure à la fréquence incidente : c'est le **processus de diffusion Raman Stokes**. Pour cela la molécule ou l'atome excité transite vers un état virtuel et revient sur un niveau vibrationnel supérieur à celui d'origine avec émission de rayonnement.
- Une autre petite partie des photons diffusés l'est à une fréquence supérieure à la fréquence incidente : le **processus de diffusion Raman anti-Stokes**. Dans ce dernier cas, moins probable donc moins intense, la molécule ou l'atome excité transite par un état virtuel puis redescend sur un niveau inférieur.

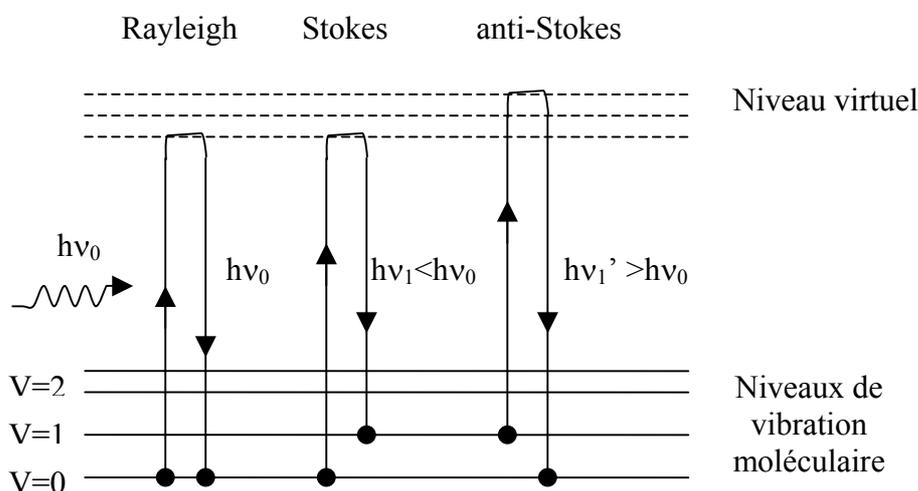


Figure 4.1 : Les trois mécanismes de diffusion : Rayleigh, Raman Stokes et Raman anti-Stokes

Les diffusions Raman Stokes et anti-Stokes se distribuent symétriquement par rapport à l'excitatrice de fréquence ν_0 (figure 4.2). Ce sont les raies Stokes qui sont les plus intenses, car elles correspondent à un phénomène plus probable, et qui sont donc utilisées pour les études de diffusion Raman.

Les valeurs des fréquences Raman sont référencées par rapport à l'excitatrice et non pas de manière absolue. En outre les spectroscopistes ont pris habitude de travailler en unités de nombre d'onde ($\nu = 1/\lambda$, λ en cm) et non de longueur d'onde. Un spectre Raman se trouve ainsi généralement compris entre 0 cm^{-1} (raie Rayleigh \equiv référence excitatrice) et 4000 cm^{-1} .

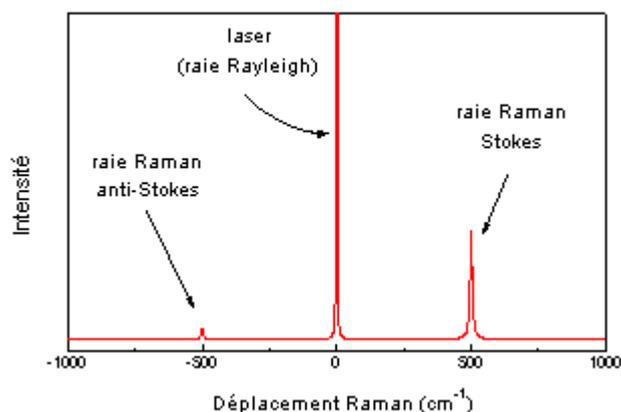


Figure 4.2 : Symétrie des raies Stokes et anti-Stokes par rapport à la raie Rayleigh (excitatrice)

Comme la spectroscopie IR, la spectroscopie Raman met en jeu les états d'énergies vibrationnels et rotationnels d'une molécule et donne des renseignements sur la structure des composés : nature et environnement des atomes, distances interatomiques, symétrie, constantes de force, structures cristallines....

Un spectre Raman constitue donc une forme d'empreinte vibrationnelle et rotationnelle du composé analysé au niveau moléculaire et/ou cristallin. Il se présente comme un ensemble de raies d'intensités variables dont les positions correspondent aux fréquences de vibrations existantes dans la molécule (ou groupement moléculaire) et dont l'observation est permise par les règles de sélection de la symétrie moléculaire.

2. Avantages et inconvénients de la technique de spectroscopie Raman

2.1. Avantages

- La spectroscopie Raman est utilisée pour la caractérisation de presque tous les types de matériaux : matériaux cristallisés, amorphes, verres, catalyseurs, semi-conducteurs, matériaux carbonés, composés inorganiques et organométalliques, minéraux, polymères.... Elle est utilisée aussi pour l'étude des transitions de phase sous contraintes (haute pression, haute température).
- Facile à mettre en œuvre : pas de mise en forme particulière de l'échantillon dans la plupart des cas et possibilité d'utiliser de cellules ou fenêtres en verre car le domaine couvert comprend UV-Visible-PIR.
- Non destructive : garantie de l'intégrité de l'échantillon (sous réserve de la puissance laser utilisée).
- Couplée à un microscope, la méthode nécessite peu de matière et présente une grande résolution spatiale (0,5 μm à quelque μm , dépendant de λ_0 et de l'objectif utilisé).

- Présente la possibilité d'effectuer des mesures en profondeur.
- Adaptée aux études en milieu aqueux.
- Facilement combinable et complémentaire à d'autres méthodes de caractérisation analytiques.
- Se prête bien aux mesures *in situ* en milieux hostiles et/ou sous contraintes (température élevée, hautes pressions, atmosphère contrôlée, radioactivité, ... etc). Possibilité d'utilisation des sondes déportées.
- Utilisable pour l'étude des milieux orientés : mesures de polarisation.
- Exaltation possible du signal par Raman de Résonance ou DRES (diffusion Raman exaltée de surface, effet SERS).

2.2. Inconvénients

- Problème de sensibilité à cause de la faiblesse du signal Raman : l'augmentation du signal Raman est possible par augmentation de la puissance laser mais entraîne souvent une dégradation de l'échantillon par échauffement ou photo décomposition.
- Fluorescence : elle peut être beaucoup plus intense que l'effet Raman en fonction de l'échantillon à étudier et de la longueur d'onde de l'excitatrice. La fluorescence masque parfois la totalité du signal Raman, mais des approches technologiques légèrement différentes permettent souvent d'éviter ce phénomène. Partiellement on peut éviter la fluorescence en utilisant des excitations en infra rouge.

3. Mise en œuvre expérimentale

Très schématiquement, un spectromètre Raman est constitué :

- d'une source de lumière monochromatique qui est généralement un laser.
- d'un compartiment échantillon pour une étude en mode macroscopique à l'échelle millimétrique ou en mode microscopique à l'échelle micrométrique; cette dernière nécessite le couplage à un microscope équipé en transmission ou/et réflexion. Il permet de sélectionner des zones particulières dans l'échantillon et d'accéder simultanément à l'information spatiale et spectrale.
- d'un monochromateur, élément dispersif à haute résolution pour la séparation des fréquences Raman.
- d'un détecteur : monocanal (photomultiplicateur) ou plus souvent maintenant multicanal (détecteur CCD).
- d'un ordinateur de pilotage équipé d'un logiciel pour l'acquisition et le traitement des spectres.

La technique consiste à focaliser à la surface de l'échantillon, ou à l'intérieur de celui-ci, une radiation monochromatique de forte densité d'énergie émise par le laser. Après excitation de l'échantillon, la lumière diffusée à des longueurs d'onde différentes, est détectée par la suite à l'aide d'un détecteur monocanal (photomultiplicateur) couplé à un système de balayage ou d'un détecteur multicanal (capteur CCD).

La figure 4.3 donne le schéma général d'un spectromètre Raman multicanal. Le détecteur utilisé peut être un capteur CCD refroidi. La figure 4.4 représente une photographie du spectromètre Raman Jobin Yvon modèle T64000 du Laboratoire PEC.

Ce spectromètre est constitué de deux étages : un étage prémonochromateur et un étage spectrographe. L'étage prémonochromateur possède deux monochromateurs à réseau 1800 traits/mm montés en configuration soustractive (ou additive). Son rôle est celui d'un filtre pour l'excitation incidente. L'étage spectrographe est un simple monochromateur dont le réseau peut être suivant l'usage, de 600 traits/mm, ou de 1800 traits/mm. La détection du signal est assurée par un capteur CCD.

La lumière qui rentre dans l'étage spectrographe est dispersée par le réseau sur toute l'étendue de la CCD. Pour chaque position du réseau une gamme spectrale dont la largeur dépend de l'énergie de la lumière incidente et du réseau utilisé est enregistrée dans un même temps. Cet instrument est particulièrement bien adapté pour des mesures de signaux faibles. Dans le cas de signaux intenses son grand avantage est le gain de temps dans l'acquisition d'un spectre. Cet instrument a différentes possibilités : il peut être utilisé en triple ou simple monochromateur suivant les conditions d'expériences requises (mesures ou non à basse fréquence, faible ou haute résolution, étendue de la bande spectrale). Il est équipé d'un microscope associé à un diaphragme confocal qui permet des mesures sur des échantillons de faibles dimensions avec une résolution spatiale de l'ordre du micron (elle dépend de la longueur d'onde et de l'objectif utilisé).

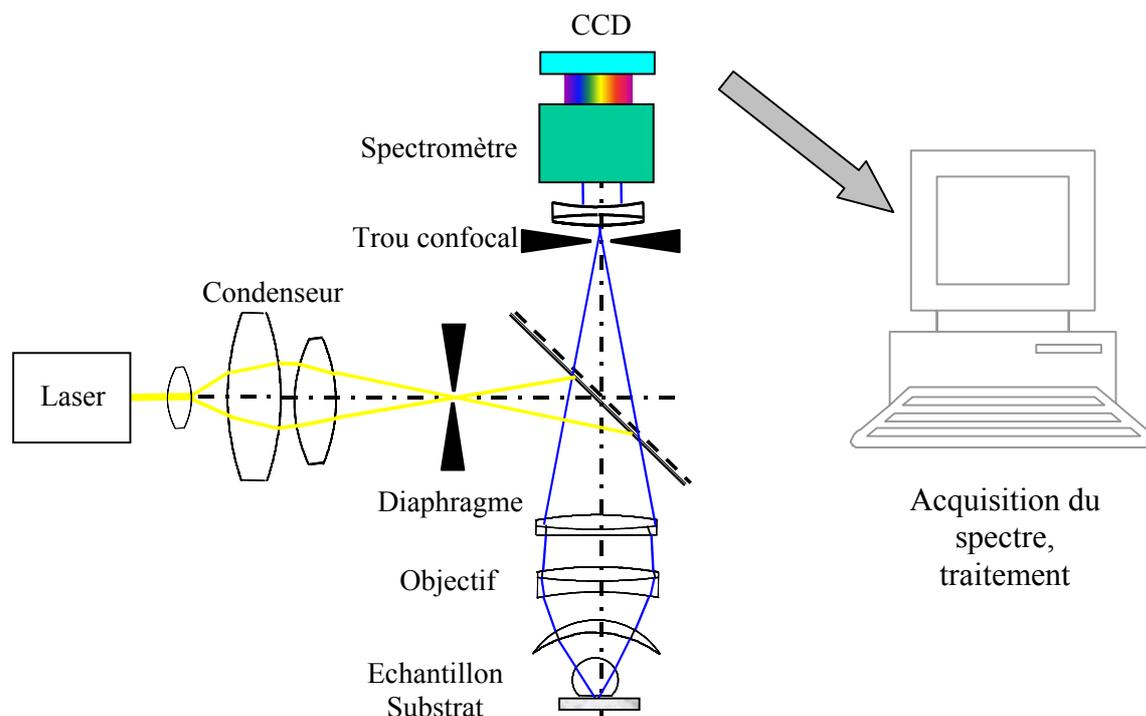


Figure 4.3 : Schéma du microspectromètre Raman

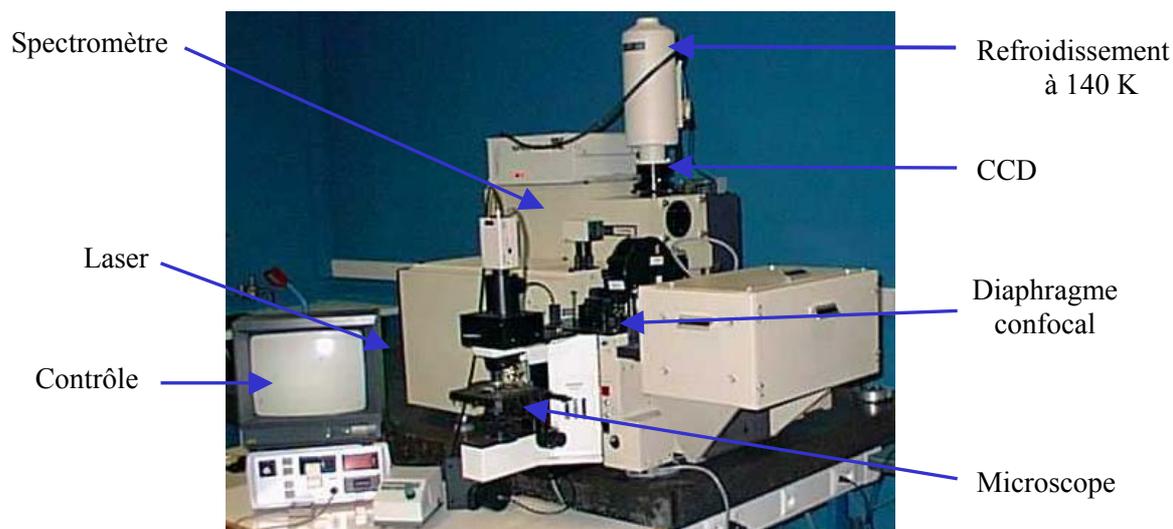


Figure 4.4 : Photographie du banc expérimental

4. Application de la spectroscopie Raman aux milieux biologiques

Actuellement la spectroscopie Raman tend à se généraliser dans le domaine biomédical et dans le domaine de la microbiologie[1]. Tout comme la spectroscopie infrarouge, cette technique donne des informations sur la composition chimique, la structure moléculaire et les interactions moléculaires d'une cellule ou d'un tissu. De même, il est possible, par exemple, d'analyser des systèmes biologiques complexes comme des cellules ou des tissus dans le domaine du cancer[2] ou d'identifier des microorganismes[3].

Différents travaux ont été effectués en biologie avec utilisation de la spectroscopie Raman. A titre d'exemple, on trouve la caractérisation et l'étude des biofilms[4] par détermination de leur composition chimique, leur organisation structurale, leurs mécanismes de transport. En effet, les microorganismes adhèrent aux surfaces de façon naturelle, ce phénomène est observé quels que soit les milieux de suspension (air ou liquide) et la nature des supports rencontrés (tissus animaux, végétaux, polymères, aciers inoxydables...). Les biofilms qui résultent de cette adhésion ont un impact important sur la productivité industrielle, sur le domaine hospitalier ou les réseaux de distribution d'eau potable et peuvent poser des problèmes de santé publique lorsque ceux-ci contiennent des germes pathogènes. Cependant, un biofilm peut aussi constituer une surface biologiquement active utilisable dans le domaine des biotechnologies.

A l'université de Reims, l'équipe du Professeur Michel Manfait (Unité MÉDIAN, UMR CNRS 6142), a notamment travaillé sur la caractérisation et l'identification des microorganismes par spectroscopie vibrationnelle classique ou en utilisant la technique spécifique de type SERS[5]. Ils ont mis en évidence, sur la base des spectres, des différences significatives entre bactéries sensibles et résistantes aux β -lactamines. Ils se sont également intéressés à l'étude des microcolonies bactériennes. En effet, le diagnostic par les méthodes courantes de microbiologie nécessite en général 2 à 3 jours et implique la culture des microorganismes jusqu'à l'obtention d'une biomasse suffisante pour les différentes analyses

alors qu'avec la microspectroscopie Raman un diagnostic peut être donné au bout de 6 heures à l'échelle d'une microcolonie, ce qui montre son intérêt.

III. Etude bibliographique sur la caractérisation des microorganismes par diffusion Raman

L'étude des microorganismes par spectroscopie vibrationnelle Raman apparaît être une méthode fiable, non destructive, rapide et sensible pour la caractérisation et l'identification des cellules biologiques. En effet, des méthodes biologiques utilisées, bien qu'elles soient de plus en plus perfectionnées, aucune n'est complète car elles sont limitées par le critère d'étude choisi qui est rarement représentatif du critère multifactoriel d'un état ou d'une fonction cellulaire. De plus ces méthodes demandent un temps considérable, 3 à 4 jours voire plus selon les analyses.

La spectroscopie Raman est une méthode capable de rendre compte de l'état physico-chimique d'une bactérie. Cet état ou « empreinte » varie avec l'état physiologique de la cellule, son âge et son environnement. En effet, cette méthode est sensible aux changements moléculaires induits par les variations de composition chimique. Le spectre d'une bactérie est spécifique, car la proportion des différents constituants protéiques, lipidiques, glucidiques et minéraux varie selon la nature des micro-organismes. C'est donc une image de la composition chimique et biochimique totale de la souche étudiée. Cependant, dans une première approche, les spectres de différents micro-organismes semblent être très similaires. Ces similarités sont dues au fait que les micro-organismes contiennent beaucoup de constituants fonctionnels et structurels semblables.

Les principaux travaux publiés à ce jour ont été menés sur des cellules isolées ou sur un ensemble de bactéries (colonie). En effet, contrairement à l'étude des matériaux classiques, les bactéries sont des échantillons vivants sensibles à toute variation environnementale et en particulier la température. Les conditions expérimentales sont donc primordiales.

Les travaux effectués pour la caractérisation physico-chimique et l'identification des microorganismes sont menés par spectroscopie Raman classique pour différentes longueurs d'onde de l'excitatrice, dans le visible, en particulier dans le rouge ($\lambda = 638,2$ nm), dans l'infrarouge ($\lambda = 830$ nm) ou encore dans l'ultraviolet ($\lambda = 228,9, 244$ et $248,2$ nm). On note aussi l'utilisation du Raman exalté dit SERS (Surface-Enhanced Raman Scattering) en cas d'étude des cellules isolées afin d'exalter le signal Raman.

Dans cette étude bibliographique, nous recensons les protocoles de préparation des bactéries.

1. Préparation des bactéries et choix du substrat

1.1. Préparation des bactéries

En général, pour la préparation des bactéries, le protocole suivi par les chercheurs est décrit comme ci-dessous[6,7,8,9,10]:

- Les bactéries sont cultivées en milieu solide (boîtes de Pétri) ou liquide (over-night) pendant 12 heures.

- Afin d'éliminer toute trace du milieu de culture, les bactéries sont lavées avec de l'eau distillée, ou autre solution, par centrifugation d'un petit volume de la solution bactérienne.
- Les bactéries sont ensuite mises en solution dans l'eau distillée.
- Pour l'analyse, une goutte de cette solution est séchée sur un substrat; on peut alors travailler facilement avec des bactéries isolées.

1.2. Choix du substrat

Le substrat est choisi en fonction de son spectre Raman. En effet, il faut un substrat qui contribue le moins possible au signal Raman. De ce fait, l'équipe de C. Schuster[6] a comparé le spectre de trois substrats : verre, quartz et fluorure de calcium (CaF_2). La figure ci-dessous reproduit leurs résultats[6]:

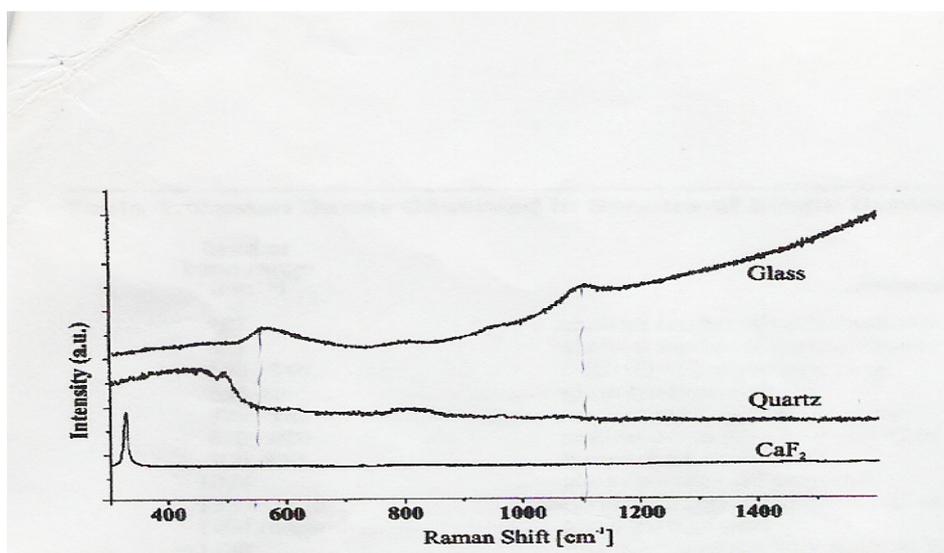


Figure 4.5 : Spectre Raman des trois substrats : verre, quartz et le CaF_2 [6]

Les spectres sont mesurés avec une excitation dans le visible à $\lambda = 632,8$ nm. Selon ces spectres, on constate que le verre a une bande de luminescence très intense ce qui peut masquer le signal Raman d'une bactérie. Le quartz semble meilleur pour les hautes fréquences supérieure à 500 cm^{-1} . Si on compare le spectre du quartz avec celui du CaF_2 , il apparaît que CaF_2 représente un meilleur substrat pour les bactéries. En effet, ce substrat n'a qu'un seul pic à 322 cm^{-1} et aucune bande de fluorescence pour les basses et hautes fréquences. Notons également que l'équipe du Professeur M. Manfait et du Docteur G. Sockalingum utilise un substrat de ZnSe également sans signal Raman dans la zone étudiée.

2. Analyse et caractérisation des bactéries avec excitation dans l'ultraviolet

La spectroscopie Raman en ultraviolet est largement utilisée pour l'étude et la caractérisation physico-chimique des molécules complexes comme dans le cas des bactéries[11,12,13,14,15,16]. Les données Raman associées aux méthodes d'analyse statistiques comme l'ACP (Analyse en Composantes Principales), ADF (Analyse des

Discriminantes Fonctionnelles) et CHA (Classification Hiérarchique Ascendante) représentent une approche rapide et fiable pour l'identification et la caractérisation des microorganismes.

De nombreux travaux sur le sujet ont été effectués. L'équipe de C. Schuster[8] s'est intéressée à la caractérisation et l'identification des bactéries. Ils ont travaillé sur plusieurs types de bactéries, essentiellement *Escherichia coli* (Gram -) et *Bacillus Subtilis* (Gram +) avec trois longueurs d'onde excitatrices ($\lambda = 228,9, 244$ et $248,2$ nm). Ils ont comparé les spectres des différentes bactéries (Gram+ et Gram-) pour les trois longueurs d'onde et ils ont étudié l'évolution des spectres de *Escherichia coli* pendant les trois phases de croissance.

La figure 4.6 donne un exemple des spectres des bactéries obtenus avec une excitation en ultraviolet ($\lambda = 228,9$ nm). Il s'agit des bactéries *Escherichia Coli* et *Bacillus Subtilis* pendant la phase de croissance exponentielle[8]. L'étude est effectuée sur une seule cellule isolée.

A la première approche, le spectre d'une bactérie de type Gram+ et celui d'une bactérie de type Gram- semblent être très similaires (figure 4.6); une étude des rapports d'intensité de raies caractéristiques a donc été menée. Ainsi le rapport $I(1618 \text{ cm}^{-1}) / I(1555 \text{ cm}^{-1})$ est supérieur pour une bactérie de Gram+ à celui d'une bactérie Gram- (figure 4.6).

D'autres auteurs ont également travaillé sur des bactéries isolées. Par exemple, l'équipe de C. Lopez[10] a travaillé à $\lambda = 244$ nm sur des bactéries de la famille *Bacillus*. Selon leurs résultats, un spectre Raman dans l'ultraviolet est dominé par les acides nucléiques et les acides aminés (Tyrosine, Tryptophane) avec absence du pic correspondant au Phénylalanine. Pour l'analyse et la classification des bactéries, les spectres Raman sont ensuite analysés avec les méthodes statistiques (ACP, ADF ou CHA[10]).

L'équipe de R. Jarvis[17] s'est intéressée à l'identification des microorganismes pathogènes tel que *P.mirabilis*, *Enterococcus Spp.* et *klebsiella Oxytoca*. En comparant les spectres des différentes souches, aucune différence significative n'a été observée. La discrimination des bactéries est faite ensuite à partir des méthodes d'analyse ACP, ADF et CHA.

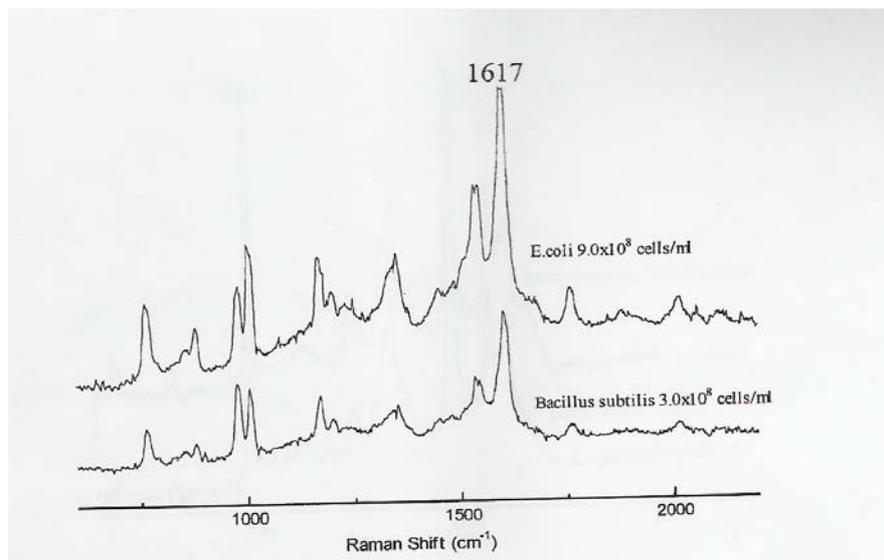


Figure 4.6 : Spectre Raman d'*Escherichia Coli* et *Bacillus Subtilis*[8]

3. Analyse et caractérisation des bactéries avec excitation dans l'infrarouge

W. Huang et son équipe[9] ont utilisé la spectroscopie Raman avec une excitation dans le proche-infrarouge afin d'analyser des cellules isolées, de faire une discrimination entre différentes espèces (trouver l'empreinte caractéristique de chacune) et d'étudier l'influence de la phase de croissance et du milieu de culture sur le spectre d'une bactérie.

Ils ont travaillé sur des bactéries de type Gram+ (*Citrobacter sp.*) et des bactéries de type Gram- (*Escherichia coli*). Ces deux souches sont difficiles à distinguer par les méthodes biochimiques traditionnelles. Selon leurs résultats, les spectres obtenus sont similaires et pour une classification des bactéries, ils ont donc utilisé les techniques d'analyse par ADF et ACP. En fonction des phases de croissance, les rapports d'intensités présentent des différences. En effet, les rapports acide nucléiques/protéines, acides nucléiques/lipides et acides nucléiques/carbohydrates en phase exponentielle sont supérieurs à ceux de la phase stationnaire. En revanche, en phase stationnaire, l'intensité de la bande d'amide I est plus intense qu'en phase exponentielle. Cette différence est due à la variation physiologique en fonction du temps de la membrane polysaccharide, des protéines et des acides nucléiques.

D'autres équipes ont travaillé sur des colonies pour une caractérisation globale d'une population bactérienne ou sur des cellules isolées et fixées afin d'avoir une empreinte spécifique à une seule cellule[18, 19, 20, 21].

La figure 4.7A donne un exemple des spectres des bactéries obtenus avec une excitation en proche-infrarouge ($\lambda = 830$ nm)[19]. Il s'agit des bactéries *S.aureus ATCC*, *S.aureus UHR*, *S.epidermidis UHR*, *E. coli* et *E.feacium*. L'étude est effectuée sur des microcolonies âgées de 6 heures. Les spectres présentés sur cette figure représentent chacun une moyenne sur 5 spectres, le temps d'acquisition de chaque spectre est de 2,5 minutes. La figure 4.7B montre le dendrogramme de classification des quatre souches bactériennes obtenu selon la technique d'analyse CHA.

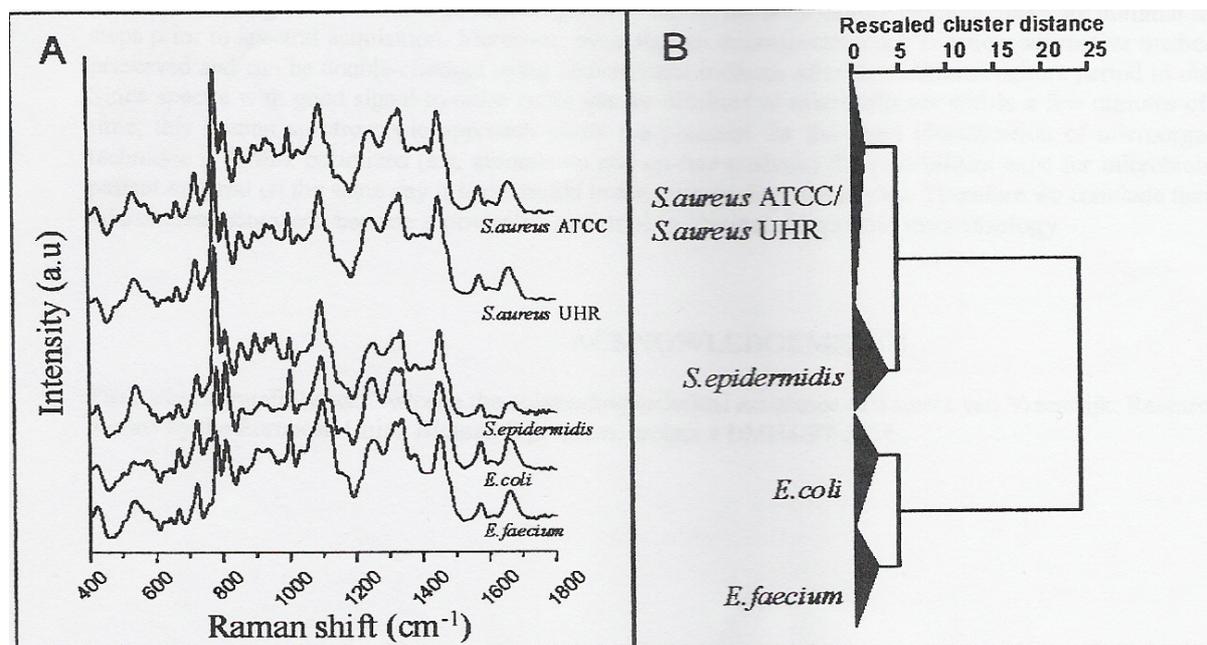


Figure 4.7 : A : Spectres Raman de 5 souches bactériennes (*S.aureus* ATCC, *S.aureus* UHR, *S.epidermidis* UHR, *E. coli* et *E.feacium*)[19]
B : Dendrogramme de classification des souches obtenu selon la technique CHA[19]

4. Analyse et caractérisation des bactéries avec excitation dans le visible

Avec une excitation dans le visible, en particulier dans le rouge, d'autres chercheurs se sont intéressés à la caractérisation et la discrimination des microorganismes. C. Schuster et son équipe[6,7] ont travaillé sur la bactérie *anaerobic bacterium clostridium beijerinckii* afin d'obtenir une caractérisation et faire par la suite une étude d'hétérogénéité dans une population microbienne. Ils ont travaillé dans un premier temps avec la longueur d'onde $\lambda = 514$ nm mais le spectre obtenu était dominé par la fluorescence. De bons résultats ont été obtenus pour $\lambda = 632,8$ nm. Sur ces spectres, on constate la présence de quatre groupements moléculaires, carbohydrates, lipides, protéines et les acides nucléiques qui caractérisent en général les cellules, en plus on trouve d'autres regroupements tels que le phénylalanine à 1001 cm^{-1} et le glucose à 407 cm^{-1} .

Selon C. Schuster[6], un spectre Raman d'une bactérie est considéré bon si on trouve la présence des composants ci-dessous avec distinction par rapport au niveau de bruit :

- Carbohydrates ($1030 - 1130\text{ cm}^{-1}$)
- Phénylalanine ($\approx 1004\text{ cm}^{-1}$)
- Acides nucléiques (780 cm^{-1}).

La figure 4.8 représente le spectre obtenu dans le visible ($\lambda = 632,8$ nm) d'une seule bactérie isolée de type *Clostridium acetobutylicum*[7], séchée sur un substrat de CaF₂. Le temps d'acquisition d'un seul spectre est de l'ordre de 60 à 200 secondes.

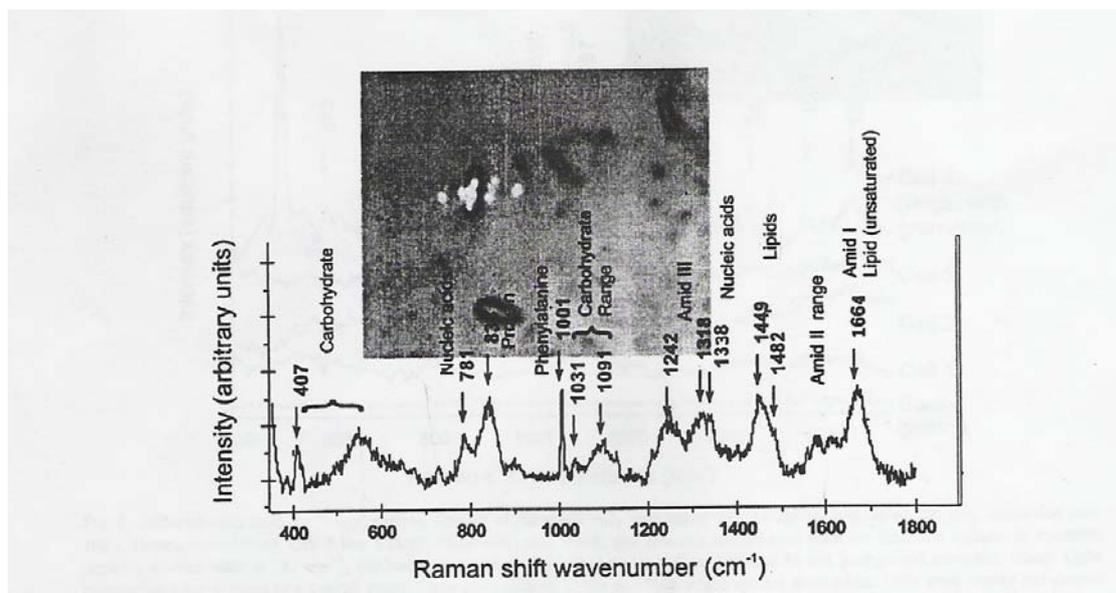


Figure 4.8 : Spectre Raman d'une seule bactérie de type *Clostridium acetobutylicum*[7]

5. Spectroscopie Raman SERS (Surface-Enhanced Raman Scattering)

La spectroscopie Raman SERS (Surface-Enhanced Raman Scattering) est une technique complémentaire à la diffusion Raman classique. Cette méthode diffère par la préparation des échantillons : en effet, les composés étudiés doivent être adsorbés sur des substrats d'argent, d'or ou de cuivre ou dans des gels contenant ces métaux. Il se produit alors une exaltation des champs électromagnétiques sur ou proche du matériau de surface, et par conséquent l'intensité Raman est considérablement augmentée. En effet, cette amplification du signal est due à deux phénomènes : l'une purement électromagnétique et l'autre chimique grâce au transfert de charge entre le métal et la molécule adsorbée ou inversement.

Les molécules adsorbées sur la surface métallique présentent une augmentation de la section efficace de diffusion Raman. Cette augmentation dépend de la nature chimique de la molécule adsorbée, du type de la surface métallique. En effet, l'activité SERS va dépendre de la surface utilisée et de sa préparation :

- Homogénéité
- Rugosité (géométrie de la rugosité de surface)
- Support (nature)
- Taille
- Propriétés d'absorption.

L'exaltation la plus importante se produit généralement avec l'argent, l'or et le cuivre[22]. Pour des applications biochimiques et biomédicales en spectroscopie SERS, le système de particules colloïdales[23] présente des avantages importants comme la simplicité de préparation, et ce dans différents solvants et milieux; en particulier dans les tampons aqueux de pH fixe.

Cette technique SERS a été utilisée pour plusieurs études de composés biologiques ou pour modéliser l'interaction entre un médicament et sa cible.

Parmi ces études, l'équipe de R. Jarvis[24,25,26] a travaillé sur la discrimination des microorganismes. Ils ont utilisé une solution colloïdale d'argent, préparée selon le protocole de H. Munro[27]. Pour classer les bactéries, les spectres Raman sont ensuite analysés par les méthodes analytiques ADF et CHA.

La technique SERS est utilisée par d'autres équipes[28] comme un substrat actif pour un ensemble de biomolécules immobilisées. Ils ont montré la faisabilité de cette technique pour identifier un ensemble de biomolécules, déterminer l'état physiologique des bactéries et distinguer entre microorganismes viables et non viables.

La figure 4.9 représente un spectre Raman SERS de la bactérie *P. aeruginosa*[29], elle donne une comparaison entre un spectre obtenu pour une bactérie en contact avec les particules colloïdales d'argent et un spectre classique. La puissance du laser étant de quelques mW (2 à 3 mW). Il apparaît clairement que le SERS est souhaitable pour l'étude et la caractérisation des éléments ayant un faible signal Raman, ce qui est le cas d'une bactérie.

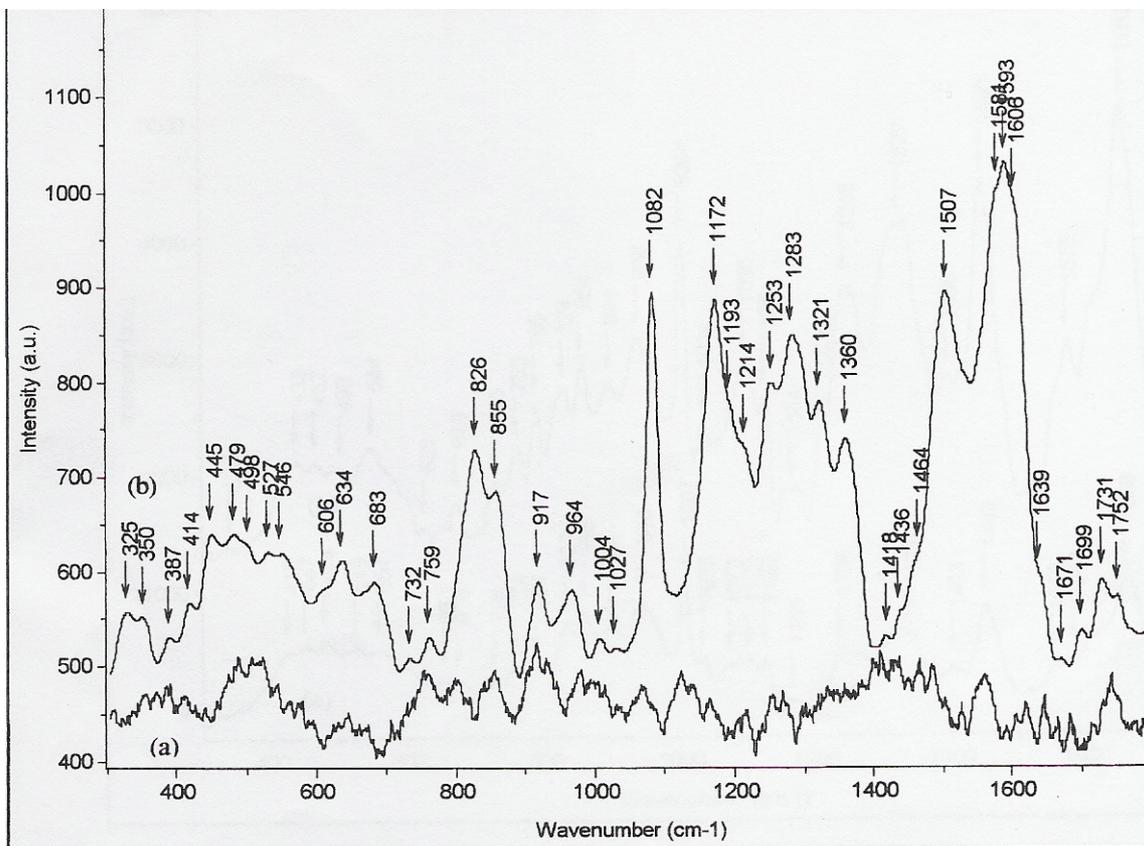


Figure 4.9 : Spectre Raman SERS de la souche *P. aeruginosa*[29]

(a) : Spectre de la souche sans contact avec les particules colloïdales d'argent

(b) : Spectre de la même souche en contact avec les particules colloïdales d'argent

6. Conclusion

A partir des travaux présentés dans cette étude bibliographique, il apparaît qu'il n'est pas aisé de travailler avec des échantillons aussi complexes que les microorganismes. En effet, les bactéries sont des éléments vivants qui sont influencés par l'environnement.

Dans une étude par spectroscopie Raman, pour la caractérisation et l'identification des bactéries, plusieurs paramètres doivent être contrôlés :

- **Préparation des bactéries** : les analyses s'effectuent directement sur des colonies ou cellules isolées et séchées sur un substrat après une culture en milieu liquide ou solide, dans des boîtes de pétri contenant de l'agar.
- **Longueur d'onde excitatrice** : la plupart des travaux sont effectués avec une excitation en ultraviolet, en proche-infrarouge ou en visible. Dans le visible, essentiellement on note l'utilisation des longueurs d'onde suivantes : $\lambda = 514,5, 632,8$ et 785 nm.
- **Puissance du laser** : elle doit être ajustée à une faible valeur pour s'assurer d'un état physiologique viable et pour ne pas avoir de dégradation des bactéries.
- **Substrat** : le signal Raman des bactéries étant très faible, le substrat joue un rôle important dans la contribution au spectre. Selon les études sur plusieurs substrats, le CaF_2 semble le plus adapté pour les bactéries.
- **Objectif de microscope** : un objectif $\times 100$ avec une ouverture numérique grande ($\text{ON} = 0,9$) est utilisé pour la plupart des expériences car les dimensions d'une cellule sont de l'ordre de quelques micromètres.
- **Traitement des spectres** : le spectre brut d'une bactérie est traité par la suite par soustraction de la ligne de base et filtré par des filtres polynomiaux comme le filtre Savitsky-Golay.
- **Temps d'acquisition** : une acquisition de 1 à 3 minutes est suffisante pour obtenir un spectre significatif. Au-delà, l'état physiologique de la bactérie peut être affecté.

Le tableau ci-dessous regroupe l'ensemble des molécules ou groupements moléculaires principaux que l'on trouve dans une cellule bactérienne[7]:

Molécule	Nombre d'onde (cm ⁻¹)
Carbohydrates (glucose)	407-481
Acides nucléiques	778-782, 810-820
Tyrosine (protéine)	830-850
Phénylalanine (protéine)	1004
Carbohydrates	1030-1130
Lipides	1130
Amides III	1220-1290
Amides III (protéine)	1320
Amides II (C-N)	1573
Amide I	1660-1670

Tableau 4.1 : Principales bandes caractéristiques des bactéries

IV. Caractérisation physico-chimique des bactéries par spectroscopie Raman

1. Objectif

L'objectif de nos travaux étant d'étudier les possibilités de caractérisation des bactéries par spectroscopie Raman, nous avons fixé deux priorités :

- Caractérisation spectroscopique en fonction des phases de croissance afin de mettre en évidence des évolutions en fonction du temps de l'état physiologique des bactéries. Nous avons travaillé avec les bactéries *Vibrio Harveyi* et *Bacillus Subtilis*.
- Etude de l'effet du tributylétain sur la bactérie *E.Coli. TBT3*. Etudier à quel niveau de la bactérie ce toxique réagit et déterminer la concentration minimale de TBT pour laquelle il serait possible de distinguer entre une bactérie saine et une bactérie en contact avec le polluant.

2. Etude en fonction des phases de croissance

2.1. Préparation des bactéries

Pour cette première partie, nous avons travaillé avec la bactérie *Vibrio Harveyi* de type Gram – et la bactérie *Bacillus Subtilis* de type Gram +. La première se cultive dans le milieu DSMZ



n° 6904 à une température de 25 °C sous agitation alors que la seconde se cultive dans le milieu LB à 30 °C.

Nous avons effectué les mesures pendant les trois phases de croissance : phase de latence, phase exponentielle et phase stationnaire. Notre but est de voir si on peut différencier les phases et s'il existe une évolution physiologique en fonction des phases au niveau de la composition chimique des bactéries (protéines, sucres, lipides, ...).

Avant chaque croissance bactérienne, les bactéries sont placées en préculture dans un volume de 20 mL pendant environ 14 heures sous agitation à une température de 25 °C (ou 30 °C selon la bactérie). Cette préculture est nécessaire pour réaliser une croissance bactérienne. En effet, l'initiation d'une culture dépend étroitement de la concentration initiale en cellules dans le milieu. De plus, une préculture permet l'adaptation des bactéries à leur nouveau milieu et évite les phénomènes de stress.

On ajoute 1 mL de cette préculture à 100 mL du milieu de culture pour commencer une croissance bactérienne. Les prélèvements sont effectués à des intervalles de temps qui correspondent aux trois phases.

La figure 4.10 donne à titre d'exemple la courbe de croissance expérimentale de *Vibrio Harveyi* avec les temps de prélèvement pour chaque phase.

Avant l'acquisition des spectres, les bactéries sont centrifugées deux fois à 4 °C pendant 5 minutes à une vitesse de 4000g. Cette centrifugation permet de supprimer toute trace du milieu de culture par lavage, ensuite nous déposons un volume de 5 µL du culot bactérien obtenu sur le substrat de CaF₂ et on le laisse sécher pendant 10 à 15 minutes.

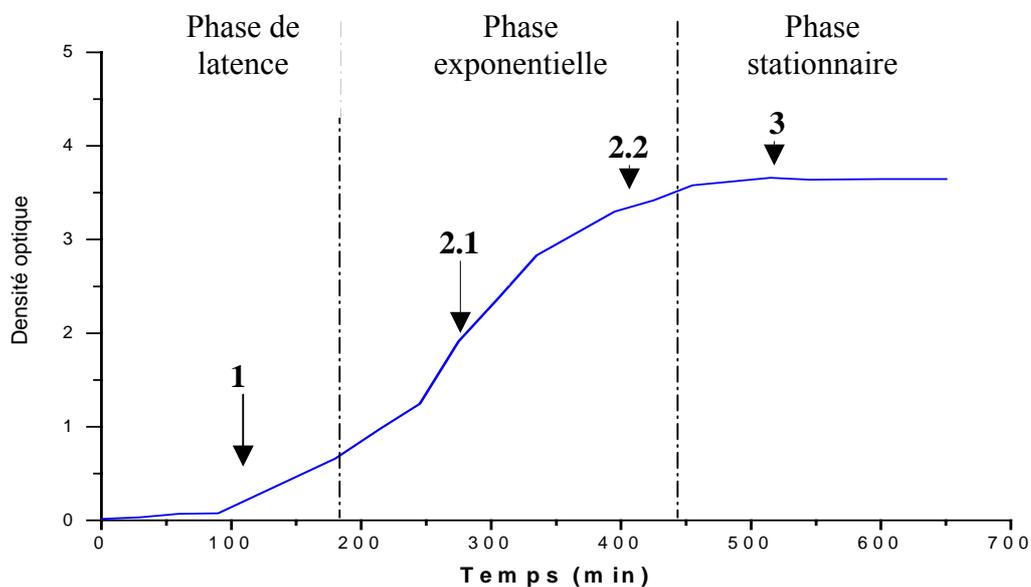


Figure 4.10 : Courbe de croissance expérimentale de *Vibrio Harveyi*

Les prélèvements ont été effectués comme suit :

- 1 : prélèvement en phase de latence à $t_1 = 100$ minutes,
- 2.1 et 2.2 : deux prélèvements en phase exponentielle :
 $t_{2.1} = 275$ minutes
 $t_{2.2} = 400$ minutes
- 3 : prélèvement en phase stationnaire à $t_3 = 500$ minutes.

2.2. Spectres obtenus avec le T64000

La figure 4.11 ci-dessous représente une image d'un culot de bactérie vu sous microscope avec un objectif de microscope de grandissement commercial $\times 100$ à longue distance de travail.

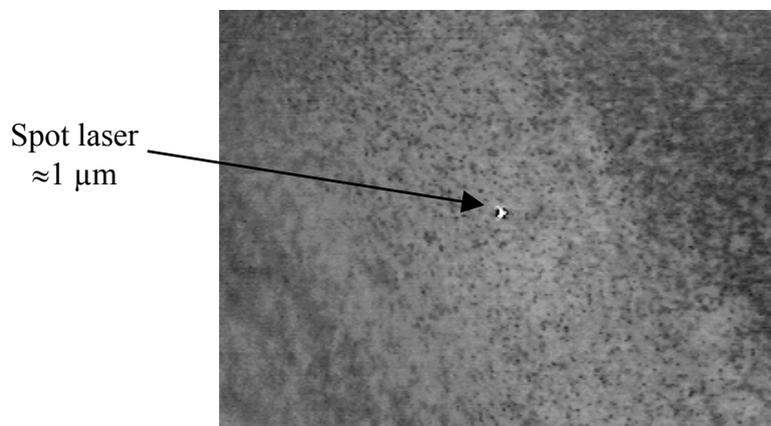


Figure 4.11 : Image sous microscope d'un culot bactérien

Nos résultats sont obtenus dans les conditions suivantes :

- Longueur d'onde de l'excitatrice : $\lambda = 647,1$ nm
- Puissance du laser : 20 mW
- Objectif : $\times 100$
- Substrat : CaF_2
- Temps d'acquisition : 300 secondes avec 3 accumulations

Dans un premier temps, nous avons essayé de travailler sur des bactéries isolées afin d'avoir une information spectrale sur une seule cellule mais aucun résultat n'a été obtenu. En effet, nous avons obtenu des spectres non significatifs avec un mauvais rapport signal sur bruit. Ainsi par la suite, nous avons choisi de travailler avec une biomasse assez importante pour obtenir des spectres exploitables.

Les figures 4.12 et 4.13 donnent les spectres obtenus respectivement de la bactérie *Vibrio Harveyi* et *Bacillus Subtilis*, pendant les trois phases. Chaque spectre représente une moyenne sur plusieurs enregistrements, ensuite les spectres sont filtrés et normalisés (normalisation vectorielle) directement avec le logiciel Labspec. Pour la phase exponentielle, nous avons effectué le prélèvement à $t_{2,1} = 275$ minutes.

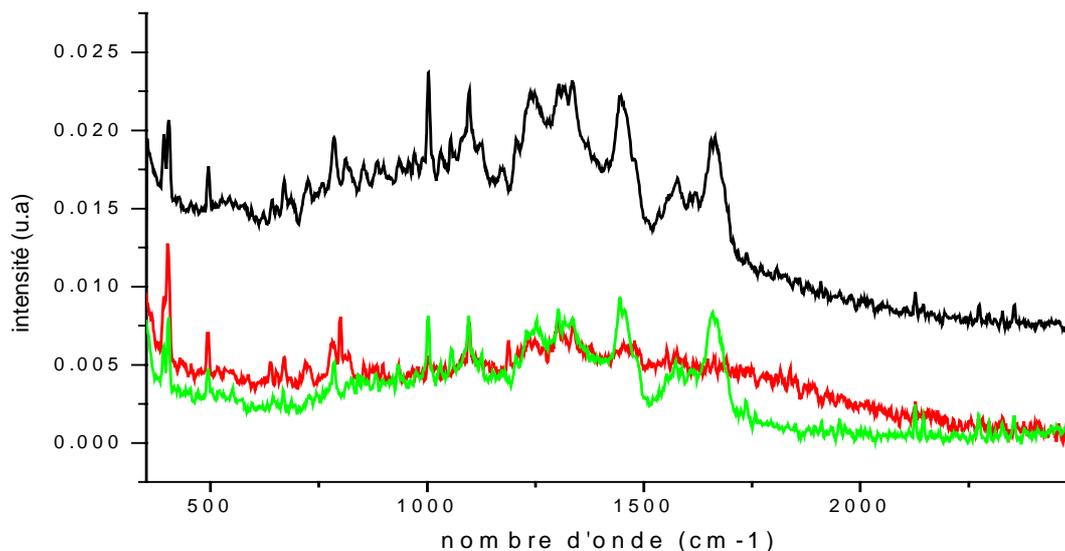


Figure 4.12 : Spectres Raman de *Vibrio Harveyi* pendant les trois phases
— Phase de latence, — Phase exponentielle, — Phase stationnaire

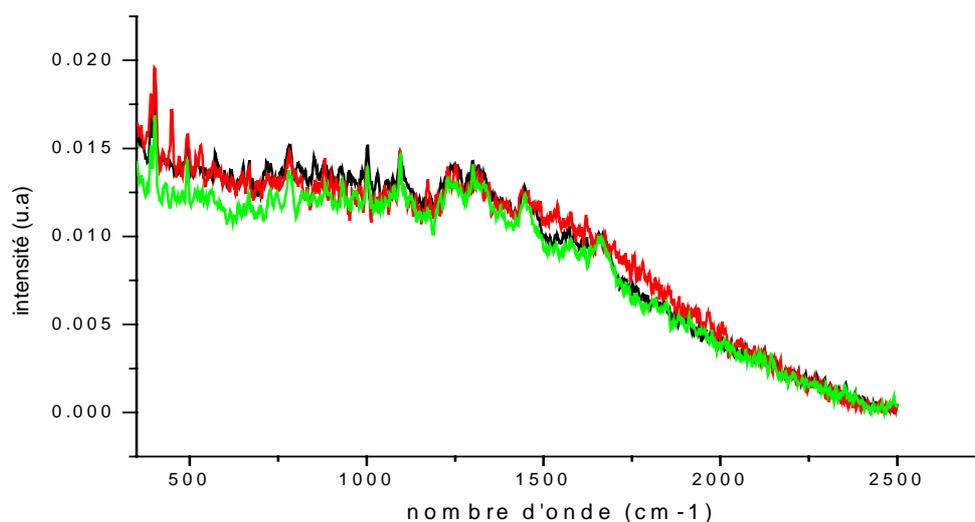


Figure 4.13 : Spectres Raman de *Bacillus Subtilis* pendant les trois phases
— Phase de latence, — Phase exponentielle, — Phase stationnaire

Avec le spectromètre du laboratoire, nous n'avons pu obtenir que des spectres avec des rapports signal/bruit assez faibles. L'analyse de ces résultats était donc difficile. En effet, on observe des bandes qui sont proches du bruit et qui sont difficiles à exploiter, en particulier en phase de latence.

Afin de remédier à ce problème, dans le cadre de la collaboration avec l'unité de MéDIAN, CNRS UMR 6142 à l'UFR de Pharmacie de l'Université de Reims Champagne-Ardenne (M. Manfait, G.D. Sockalingum et I. Adt), nous avons travaillé avec un microspectromètre de type Labram dont la compacité est un des atouts pour ce type d'analyse.

2.3. Spectres Raman obtenus avec le microspectromètre Labram

Pour la préparation des bactéries, nous avons effectué une démarche similaire. Nos expériences sont effectuées dans les conditions suivantes :

- Longueur d'onde de l'excitatrice : $\lambda = 785 \text{ nm}$
- Puissance du laser : 50 mW
- Objectif : $\times 100$, $\text{ON} = 0,9$
- Substrat : ZnSe, ce substrat n'a pas de spectre Raman dans la zone spectrale d'intérêt ($600\text{-}1750 \text{ cm}^{-1}$).
- Temps d'acquisition : 200 secondes

La figure 4.14 montre les spectres obtenus. Chaque spectre représente une moyenne sur un ensemble de 3 spectres. Les spectres sont ensuite filtrés et normalisés avec le logiciel Labspec. Le prélèvement en phase exponentielle est effectué à $t_{2,2} = 400$ minutes.

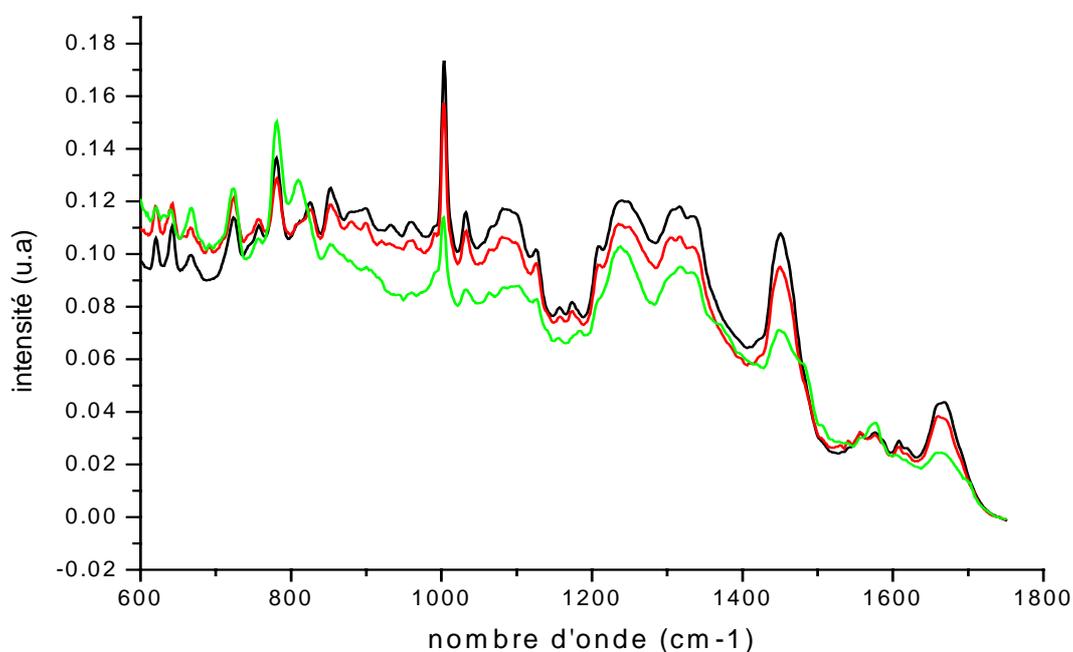


Figure 4.14 : Spectres Raman de *Vibrio Harveyi* pendant les trois phases de croissance
 — Phase de latence, — Phase exponentielle, — Phase stationnaire

A partir d'une observation directe pic à pic, les différences sont peu visibles à l'œil nu entre les phases.

Une première approche a consisté à attribuer les bandes observées qui sont nécessairement nombreuses en raison de la nature biochimique complexe des organismes étudiés.

Le tableau 4.2 ci-après regroupe les principales bandes identifiées sur les spectres. Ces bandes correspondent à la présence des éléments chimiques constitutifs des bactéries.

Composante	Nombre d'onde (cm ⁻¹)
Carbohydrates	401
Carbohydrates	500
Acides nucléiques	782
Phénylalanine	1001
Carbohydrates, phénylalanine	1031
Carbohydrates	1097
Lipides	1129
Amide III	1241
Amide III	1311
Acides nucléiques	1336
Lipides, protéines	1449
Lipides	1480
Amide II	1571
Amide I	1664

Tableau 4.2 : Composition chimique des bactéries identifiée sur les spectres

L'analyse pic à pic étant plus complexe, nous avons étudié s'il existe effectivement une évolution de l'état physiologique des bactéries au cours du temps. Nous avons utilisé la méthode de Classification Hiérarchique Ascendante (CHA).

2.4. Analyse des spectres

2.4.1. Principe de la méthode CHA

La méthode CHA permet de rechercher les principales variables explicatives d'une expérimentation mais également d'identifier les corrélations existantes entre ces différentes variables. Elle permet la recherche des familles de variables et d'individus. Ainsi, il sera possible de classer des groupes d'individus aux performances voisines. La CHA permet d'obtenir des dendrogrammes où l'on pourra observer, aussi objectivement que possible, les ressemblances et dissemblances des données.

Le principe de la méthode est de créer des pôles d'individus qui se ressemblent à partir d'un calcul de distance entre individus.

En effet :

Soit

- $\{W_1, W_2, \dots, W_n\}$ un ensemble d'individus qui appartiennent à \mathfrak{R}^n ,
- $\{X_1, X_2, \dots, X_p\}$ un ensemble de variables,

- M une matrice symétrique définie positive, elle contient les poids donnés aux variables X_i . M est une matrice identité si les variables ont la même importance.

La distance entre individu sera estimée par la relation suivante :

$$d(W_i, W_j) = \sqrt{(W_i - W_j)M(W_i - W_j)^T} \quad (4.1)$$

Dans le cas des spectres Raman, la méthode CHA permet de grouper les spectres en se basant sur leurs similarités ou distances respectives qui correspondent à la distance euclidienne entre spectres. En effet cette distance peut être calculée selon les trois formules suivantes :

$$d(S_1, S_2) = \sup_{a \leq f \leq b} |S_1(f) - S_2(f)| \quad (4.2)$$

$$d(S_1, S_2) = \sqrt{\int_a^b |S_1(f) - S_2(f)|^2 df} \quad (4.3)$$

$$d(S_1, S_2) = \int_a^b |S_1(f) - S_2(f)| df \quad (4.4)$$

avec :

- S_1 et S_2 spectres, qui sont des fonctions continues,
- f la fréquence (nombre d'onde),
- a et b bornes de la zone spectrale concernée.

2.4.2. Analyse des spectres selon CHA

Les figures 4.15 et 4.16 représentent les dendrogrammes obtenus respectivement avec une classification sur toute la gamme spectrale 600-1750 cm^{-1} et une classification uniquement sur la zone des protéines 1450-1750 cm^{-1} .

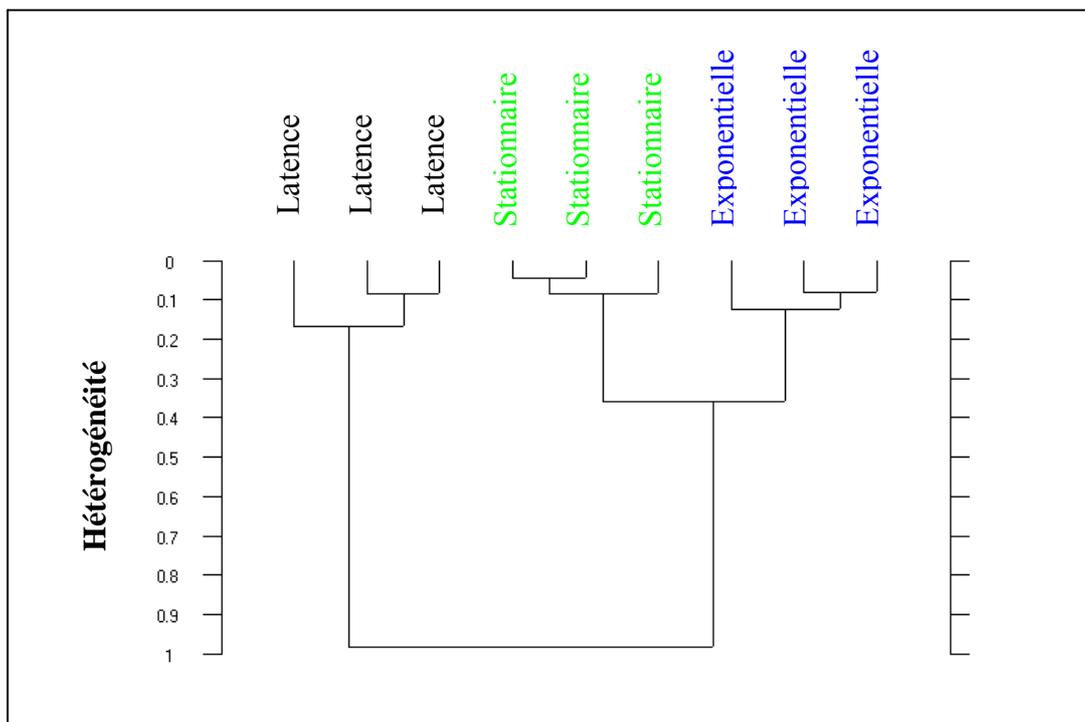


Figure 4.15 : Dendrogramme issu de la classification hiérarchique ascendante des trois phases de croissance de *Vibrio Harveyi* sur la zone spectrale 600-1750 cm^{-1}

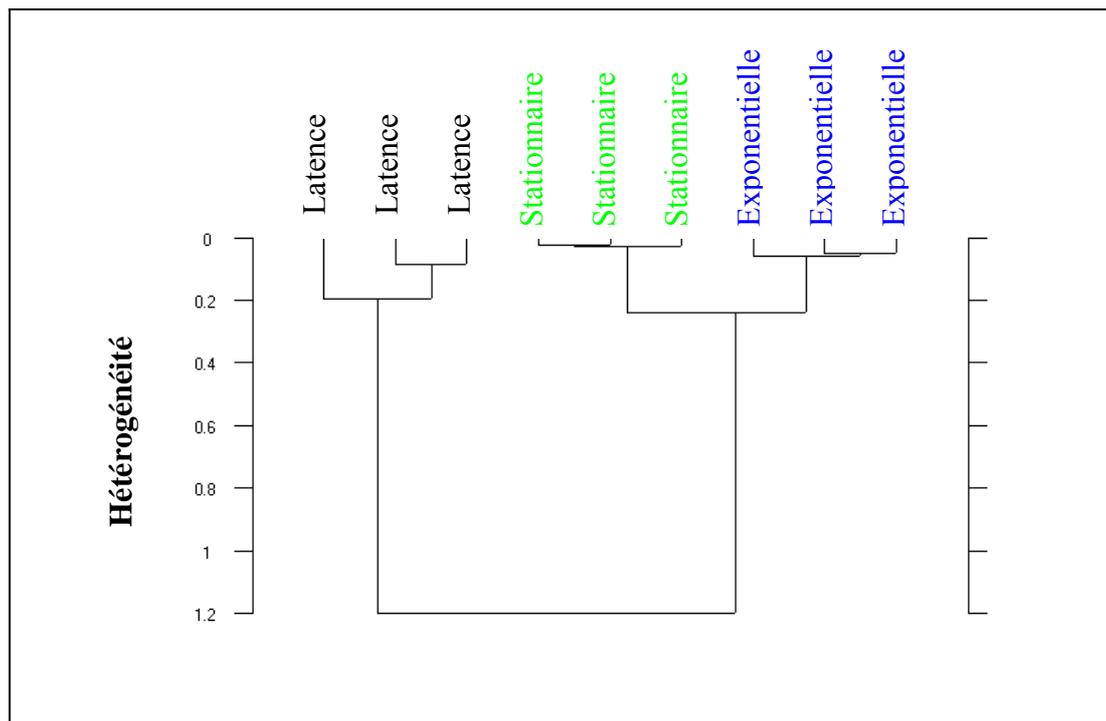


Figure 4.16 : Dendrogramme issu de la classification hiérarchique ascendante des trois phases de croissance de *Vibrio Harveyi* sur la zone spectrale 1450-1750 cm⁻¹

2.5. Conclusion

D'après les dendrogrammes représentés sur les figures ci-dessus, on constate qu'avec la spectroscopie Raman, il est possible de distinguer entre différentes bactéries prises à des temps variables dans la même culture. En effet, avec une classification basée sur toute la zone spectrale où toutes les composantes chimiques des bactéries sont présentes (600-1750 cm⁻¹), on a classé trois familles de spectres. Chaque famille regroupe les spectres qui correspondent à des prélèvements effectués en même temps, c'est une classe constituée des bactéries ayant le même état physiologique.

Sur la zone spectrale 1450-1750 cm⁻¹ où se manifestent les bandes caractéristiques des protéines, on constate une classification plus sélective. En effet, pour la phase exponentielle et la phase stationnaire, tous les spectres sont homogènes avec un indice d'hétérogénéité égal à zéro. Ceci nous permet de conclure qu'en fonction du temps, au sein d'une bactérie, la modification la plus significative s'effectue au niveau des protéines.

Par étude des rapports d'intensités intégrées, nous constatons les évolutions suivantes :

- L'intensité de la bande 1640-1700 cm⁻¹, qui correspondent aux protéines (amide I), en phase stationnaire est supérieure à la même bande en phase exponentielle et en phase de latence. Des résultats similaires sont obtenus pour les bandes des amides III, des carbohydrates et des lipides.
- Pour la bande des acides nucléiques, on observe un maximum d'intensité en phase de latence.

- Pour la bande de phénylalanine, l'intensité est identique entre phase exponentielle et phase stationnaire.

Le tableau 4.3 suivant regroupe les valeurs des intensités intégrées calculées avec le logiciel Labspec.

Bande	Phase de latence	Phase exponentielle	Phase stationnaire
Amide I (1640-1700)	0,3	0,6	0,7
Amide III (1191-1282)	1	1,2	1,3
Carbohydrates (1050-1119)	0,2	0,4	0,5
Lipides (1430-1500)	0,8	1,3	1,5
Phénylalanine (994-1020)	0,2	0,4	0,4
Acides nucléiques (766-797)	0,3	0,2	0,2

Tableau 4.3 : Intensités intégrées des bandes caractéristiques en fonction des phases de croissance

Cette étude amont de l'évolution des spectres en fonction des phases de croissance est encourageante. En effet, elle pourrait nous permettre de suivre l'état physiologique des bactéries immobilisées au cours du temps.

Cette évolution physiologique pourrait nous informer sur la fiabilité du biocapteur qui est en étroite liaison avec la réponse des bactéries en présence des polluants. En effet la bioluminescence émise par les bactéries en contact avec les polluants est fonction de la biodisponibilité du polluant mais aussi de l'état physiologique des bactéries.

3. Effet du tributylétain sur la bactérie *E. Coli. TBT3*

3.1. Préparation des bactéries

Dans cette étude, nous sommes intéressés par la discrimination entre une bactérie témoin et des bactéries exposées au TBT sous différentes concentrations.

Pour répondre à cet objectif, une colonie de la bactérie TBT3 est cultivée dans 20 mL de milieu glucose avec 20 μ L de tétracycline à une température de 37 °C, sous agitation et pendant environ 14 heures (culture en over-night). Nous avons travaillé avec une suspension bactérienne de densité optique égale à 1. Cette densité cellulaire permet d'obtenir une biomasse suffisante pour les analyses spectrales.

Nous avons choisi de travailler avec 4 concentrations de tributylétain : 1 μ M, 3 μ M, 5 μ M et 10 μ M. Ces concentrations sont préparées à partir d'une solution mère de tributylétain à 600 μ M et de l'eau de mer.

L'induction de la bactérie TBT3 avec du TBT est effectuée en ajoutant 2,5 mL de la solution de TBT à 5 mL de la suspension bactérienne. L'incubation dure une heure à une température de 30 °C avant analyse par spectroscopie Raman.

Les mesures ont été effectuées avec les mêmes préparations que précédemment pour les bactéries (Paragraphe IV.2.1).

3.2. Résultats expérimentaux

La figure 4.17 représente les résultats obtenus. Pour une moyenne sur un ensemble de 3 spectres. Ces spectres ont été filtrés et normalisés avec Labspec.

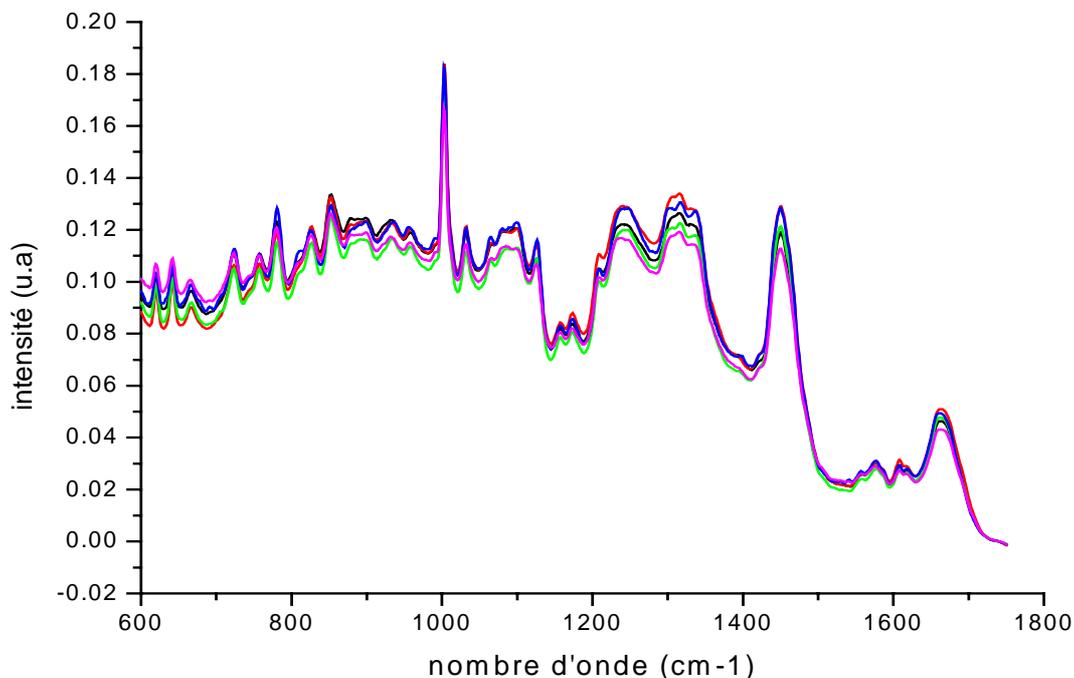


Figure 4.17 : Spectres Raman de *TBT3* avec et sans contact avec le TBT
 — : *TBT3* seule, — : *TBT3*+1µM de TBT, — : *TBT3*+ 3µM de TBT,
 — : *TBT3*+ 5µM de TBT, — : *TBT3*+10µM du TBT

D'après la figure 4.17, nous constatons peu de différences visuelles marquées entre les spectres d'une bactérie seule et ceux d'une bactérie exposée au tributylétain. Les spectres ont tous un profil similaire et on retrouve les bandes caractéristiques des microorganismes (lipides, protéines, sucres).

Afin d'étudier l'influence du toxique sur la bactérie et faire une distinction entre les différentes concentrations, nous avons utilisé la méthode CHA pour classer les spectres des bactéries en fonction de leur état physiologique.

3.3. Analyse selon CHA

Avec l'analyse CHA, nous avons classé les spectres sur toute la zone spectrale 600-1750 cm^{-1} dans laquelle on trouve la présence de toutes les bandes caractéristiques d'une bactérie. Nous avons observé que cette méthode est délicate pour différencier entre une bactérie seule et une bactérie en contact avec TBT. La seule zone où nous avons trouvé que le TBT a un effet sur la bactérie *TBT3* correspond à la zone spectrale 900-1200 cm^{-1} , où se situent les bandes caractéristiques des sucres et des lipides.

Les figures 4.18, 4.19, 4.20 et 4.21 représentent les dendrogrammes obtenus selon CHA pour la zone spectrale 900-1200 cm^{-1} .

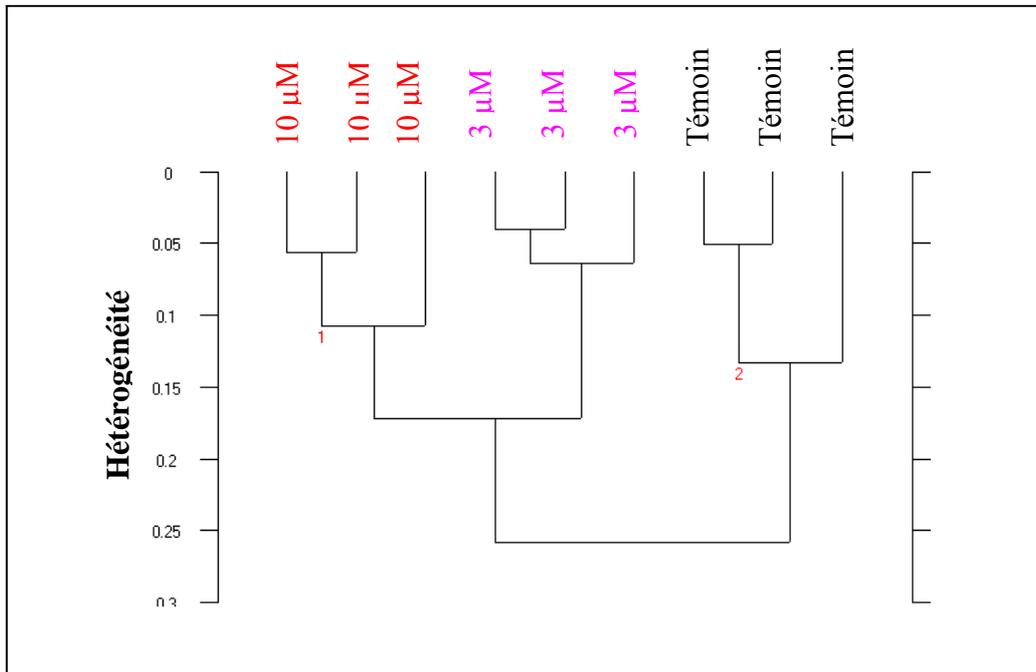


Figure 4.18 : Dendrogramme de classification hiérarchique ascendante des trois familles (témoin, 3 μM et 10 μM)

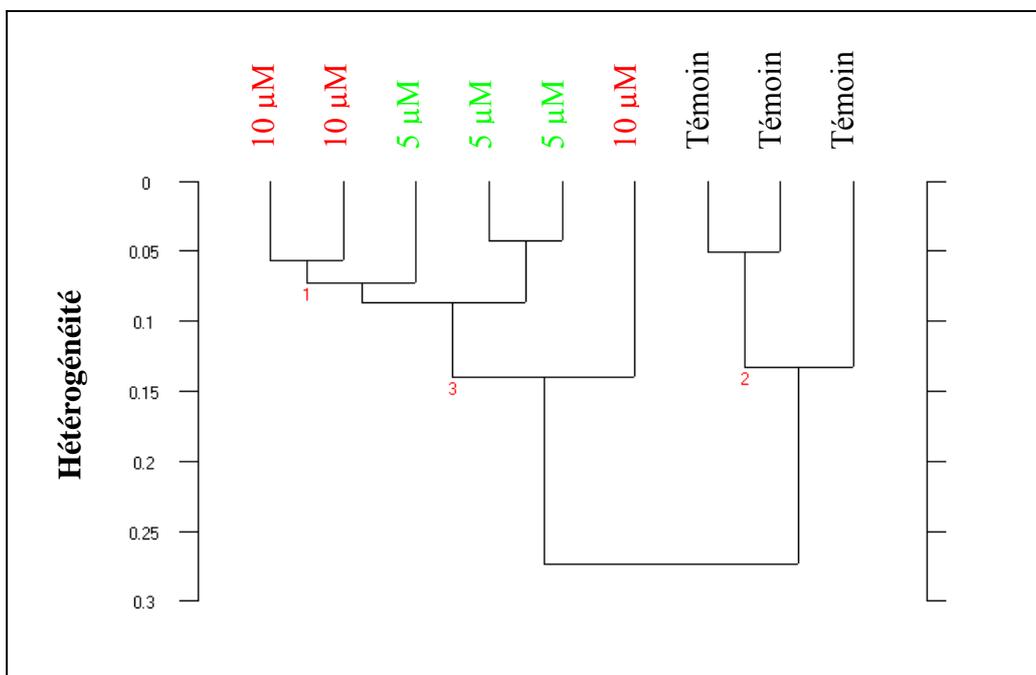


Figure 4.19 : Dendrogramme de classification hiérarchique ascendante des trois familles (témoin, 5 μM et 10 μM)

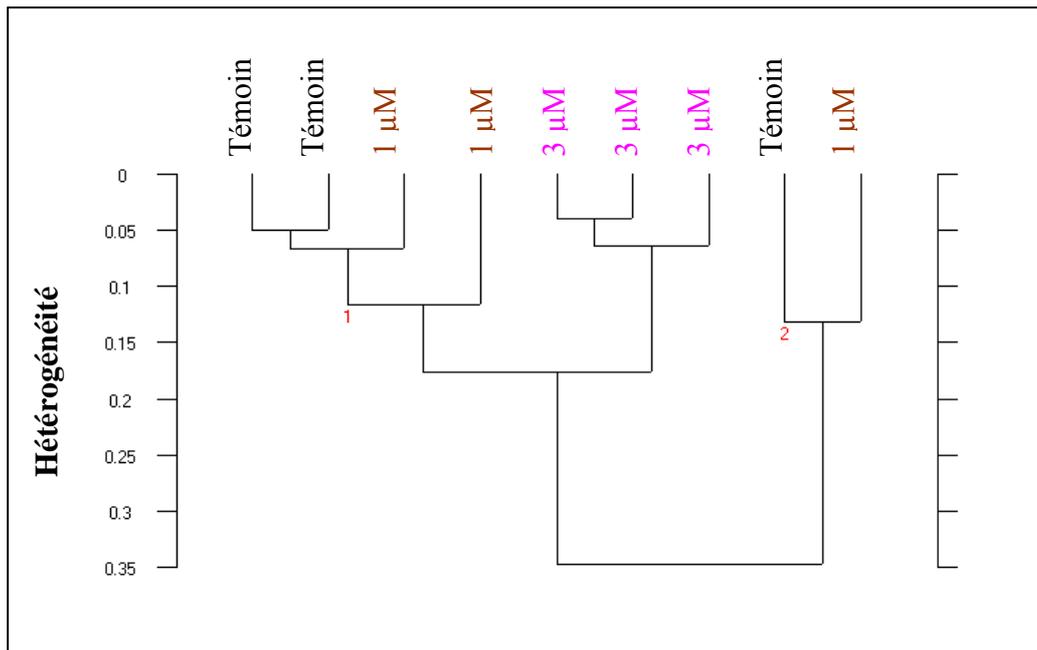


Figure 4.20 : Dendrogramme de classification hiérarchique ascendante des trois familles (témoin, 3 µM et 1 µM)

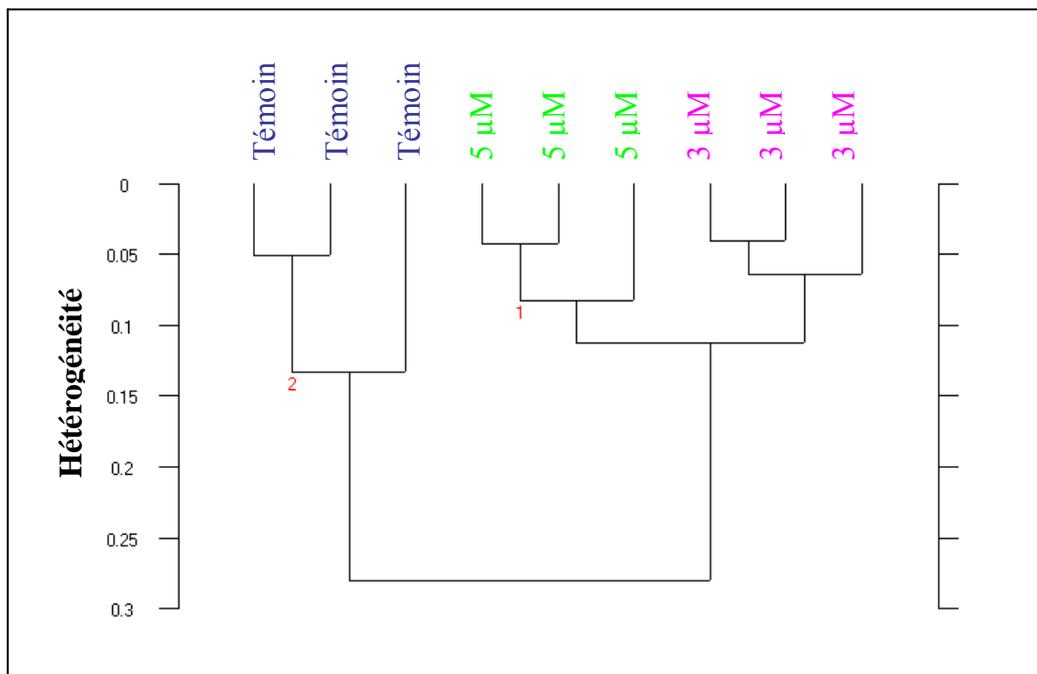


Figure 4.21 : Dendrogramme de classification hiérarchique ascendante des trois familles (témoin, 3 µM et 5 µM)

3.4. Conclusion

D'après ces dendrogrammes, on constate que, pour une concentration faible de 1 µM, on observe un mélange dans la classification des spectres de témoin (*TBT3* seule) et de *TBT3* induite par 1 µM de TBT. Pour une concentration de 5 µM et 10 µM, on constate aussi un

mélange entre spectres. Cependant pour une concentration intermédiaire de 3 μM , les spectres correspondant sont distinguables des faibles et des fortes concentrations et ils forment une classe indépendante des autres.

D'après ces résultats, nous concluons que pour une suspension bactérienne à densité optique de 1, il apparaît difficile avec la diffusion Raman de détecter la présence de TBT avec une concentration de 1 μM . Un seuil semble donc atteint. On note qu'à partir d'une concentration de 5 μM , la distinction entre les spectres Raman devient impossible. Ceci s'explique par le fait qu'à partir d'une concentration de 5 μM , il doit exister un effet de saturation au niveau des bactéries.

A partir de cette étude, on peut distinguer trois classes bien identifiées. Chaque classe regroupe les bactéries qui ont le même état physiologique :

- **Classe 1** : il n'y a pas d'effet du tributylétain sur la bactérie TBT3. Cette zone concerne les concentrations faibles en TBT, inférieures à 1 μM . Dans ce cas, l'état physiologique des bactéries ne change pas en contact avec le TBT.
- **Classe 2** : il est possible de classer les spectres des bactéries en fonction des concentrations de TBT auxquelles elles sont exposées. Cette zone concerne les concentrations comprises entre 1 μM et 5 μM .
- **Classe 3** : elle concerne les fortes concentrations, supérieures à 5 μM . Il semble qu'il y ait un effet de saturation au niveau des bactéries ce qui explique l'absence de discrimination.

La spectroscopie Raman couplée à une méthode d'analyse numérique telle que la CHA représente donc une méthode d'investigation prometteuse pour étudier l'effet des toxiques sur les bactéries.

A ce stade de l'étude, il n'est pas encore possible de déterminer la concentration exacte du TBT à laquelle une suspension bactérienne est exposée.

4. Conclusion

D'après cette étude, nous pouvons conclure que la spectroscopie Raman est une technique non destructive, in situ et rapide pour analyser l'état physiologique des microorganismes. Accompagnée d'une méthode d'analyse numérique comme la CHA, elle représente une méthode de classification efficace des bactéries en fonction de leur état physiologique (présence de toxique, changement des conditions de croissance, etc.).

V. Analyse de traces de TBT dans des peintures antisalissures par spectroscopie Raman

1. Introduction

Les navires se déplacent plus rapidement dans l'eau et consomment moins de combustible lorsque leurs coques sont propres et lisses, c'est-à-dire lorsqu'elles ne sont pas recouvertes d'organismes, tels que les algues. Une petite quantité de salissures peut, à elle seule, provoquer une augmentation de la consommation de combustible pouvant aller jusqu'à 40 %, voire même jusqu'à 50 %, en raison de l'augmentation de la résistance au mouvement.



A l'aube des transports maritimes, pour protéger la coque des navires, on utilisait de l'arsenic et des composés de mercure. Au cours des années 60, l'industrie des produits chimiques mis au point des peintures antisalissures (antifouling) efficaces et bon marché à base de tributylétain.

En tant que biocide, le tributylétain devait être toxique pour tuer de manière efficace les organismes qui adhéreraient à la coque des navires, mais son principal problème réside dans sa persistance dans le milieu marin. Dans les années 70, les recherches ont montré un lien entre la contamination par le tributylétain qui s'échappait des bateaux et le taux élevé de mortalité des larves d'huîtres et des déformations de la coquille des huîtres adultes. Ces déformations étaient tellement marquées qu'elles rendaient ces huîtres non commercialisables[30].

La figure 4.22 montre un exemple d'effet des peintures antisalissures sur les coquillages.

Actuellement, le tributylétain est interdit en tant qu'antifouling dans les peintures, cependant, aucun moyen simple n'existe sur le marché pour déterminer la conformité vis-à-vis de la législation.



Figure 4.22 : Huître exposée aux peintures antisalissures[31]

2. Objectif

La première partie de ce travail a montré la possibilité de détecter le TBT grâce à la mise en place du biocapteur Lumisens I. Dans le cadre de cette étude, qui a pour objectif initial de détecter des faibles quantités de TBT par des méthodes non invasives, nous avons complété ce travail en ajoutant à la méthode de détection du TBT dans des peintures commerciales, l'utilisation d'une technique de caractérisation physique comme la diffusion Raman. Notre objectif étant aussi d'éventuellement déterminer les concentrations par spectroscopie Raman.

Nous avons donc adopté la démarche suivante :

- Caractérisation spectroscopique du tributylétain afin de déterminer les raies caractéristiques du TBT. Une comparaison avec d'autres composés isostructuraux a été menée pour isoler les bandes caractéristiques de l'étain.
- Détection de présence ou d'absence du TBT dans les peintures. Nous disposons de trois peintures antifouling, une peinture de couleur verte sans TBT, une de couleur

noire et une troisième de couleur grise. Ces deux dernières contiennent comme antifouling du tributylétain sous forme de résine greffée (appelé cutinox). Les concentrations en TBT sont inconnues. Les peintures nous ont été fournies par un laboratoire du Sénégal.

- Détermination de la concentration minimale détectable de TBT dans les peintures. Nous disposons pour cela des échantillons de peinture verte avec différentes concentrations de TBT.

3. Analyse de la molécule $(C_4H_9)_3ClSn$

Afin d'interpréter les spectres Raman, il est important de connaître au préalable le nombre de modes de vibrations attendus. Pour cela, un dénombrement par théorie des groupes a été effectué.

La molécule de tributylétain de formulation chimique globale $(C_4H_9)_3ClSn$ possède la symétrie ponctuelle C_3 dans le cas du conformère idéal.

La figure ci-dessous donne la représentation chimique de la molécule.

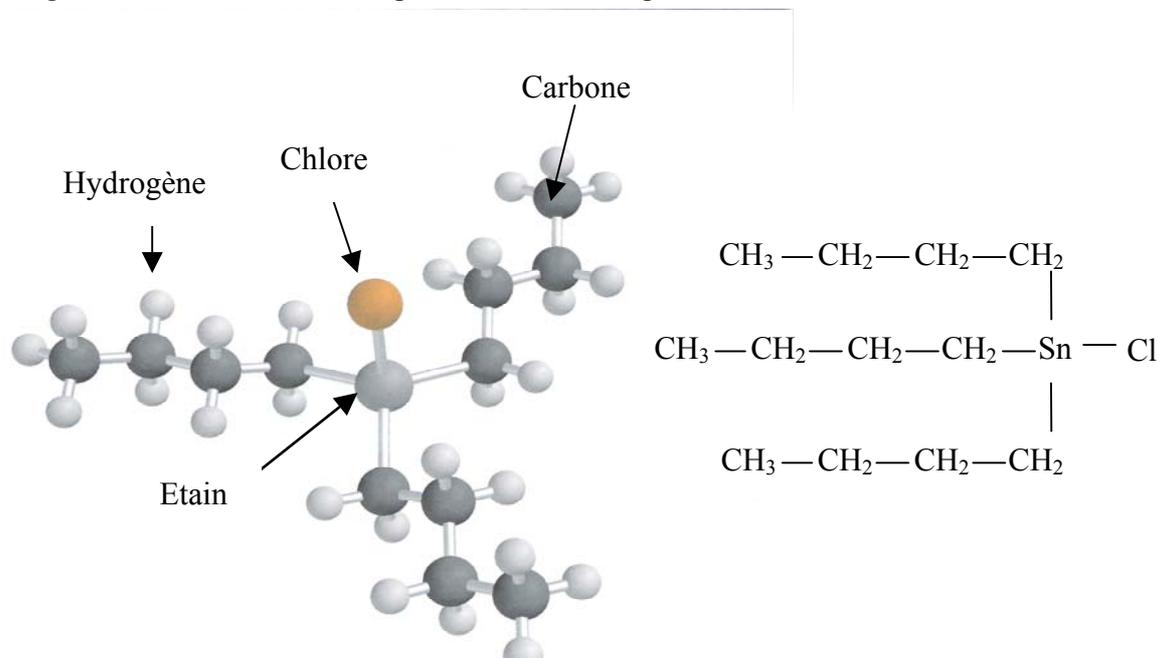


Figure 4.23 : Représentation de la molécule $(C_4H_9)_3ClSn$

Dans le cadre d'une approche simplifiée, nous assimilons la symétrie de ce composé à ce seul groupe, même si de nombreuses autres formes sont nécessairement présentes.

Pour le dénombrement, nous construisons la représentation mécanique basée sur les déplacements atomiques. Afin d'en tirer les modes de vibration, il est nécessaire de soustraire les modes de translation et de rotation :

$$\Gamma_{\text{vibration}} = \Gamma_{\text{mécanique}} - \Gamma_{\text{translation}} - \Gamma_{\text{rotation}} \quad (4.5)$$

La molécule $(C_4H_9)_3ClSn$ comporte 41 atomes ($N = 41$), soit 123 degrés de liberté ($3 \times N$), dont 3 de translation et 3 de rotation. Le nombre de modes de vibration A sera donné par :

$A = 3 \times N - 6$, d'où $A = 117$ modes de vibration.

Le nombre de modes s'obtient classiquement par décomposition sur la table de caractères du groupe de symétrie de la représentation mécanique. Ces caractères sont obtenus en multipliant le nombre d'atomes invariants, par les opérations de symétrie du groupe ponctuel, par les caractères des matrices associées dans \mathfrak{R}^3 aux opérations de symétrie du groupe ponctuel. La décomposition se fait ensuite en utilisant la relation :

$$a_i = \frac{1}{g} \sum_S \chi_i(S)^* \chi_{\text{mécanique}}(S) \quad (4.6)$$

ou

- g : désigne l'ordre du groupe, dans ce cas $g = 3$;
- $\chi_i(S)^*$: le caractère conjugué de la représentation irréductible i associé à l'élément de symétrie S du groupe ponctuel considéré;
- $\chi_{\text{mécanique}}(S)$: le caractère de la représentation mécanique associé à l'élément de symétrie S du groupe ponctuel considéré.

Cette décomposition est schématisée dans le tableau ci-dessous :

C_3	E	C_3	C_3^2	a_i
A	1	1	1	41
E	2	$\bar{1}$	$\bar{1}$	82
Nombre d'atomes invariants	41	2	2	
χ_i	3	0	0	
$\chi_{\text{mécanique}}$	123	0	0	

Tableau 4.4 : Table de caractères du groupe C_3

Cette décomposition conduit à :

$$\Gamma_{\text{mécanique}} = 41A \oplus 82E$$

$$\Gamma_{\text{translation}} = A \oplus E$$

$$\Gamma_{\text{rotation}} = A \oplus E$$

Donc le nombre de modes de vibration est :

$$\Gamma_{\text{vibration}} = 39A \oplus 80E = 119 \text{ modes de vibration.}$$

Le groupe C_3 ne possède pas de centre de symétrie donc tous les modes sont actifs. En diffusion Raman, nous attendons ainsi 119 modes de vibration visibles sur le spectre. C'est donc évidemment un spectre particulièrement riche en raies Raman.

4. Etude expérimentale de la molécule de tributylétain

Les expériences ont été réalisées avec le spectromètre Raman T64000 du Laboratoire PEC. La longueur d'onde de l'excitatrice était de 514,5 nm pour une puissance du laser de 20 mW. Les mesures sont effectuées sous microscope confocal équipé de l'objectif $\times 50$. Tous les spectres sont enregistrés entre 100 et 3100 cm^{-1} . L'échantillon de tributylétain est placé dans une cuve

en verre fermée pour éviter tout contact avec l'utilisateur (en raison de son caractère hautement toxique).

La figure 4.24 représente le spectre de référence obtenu avec une solution concentrée de TBT.

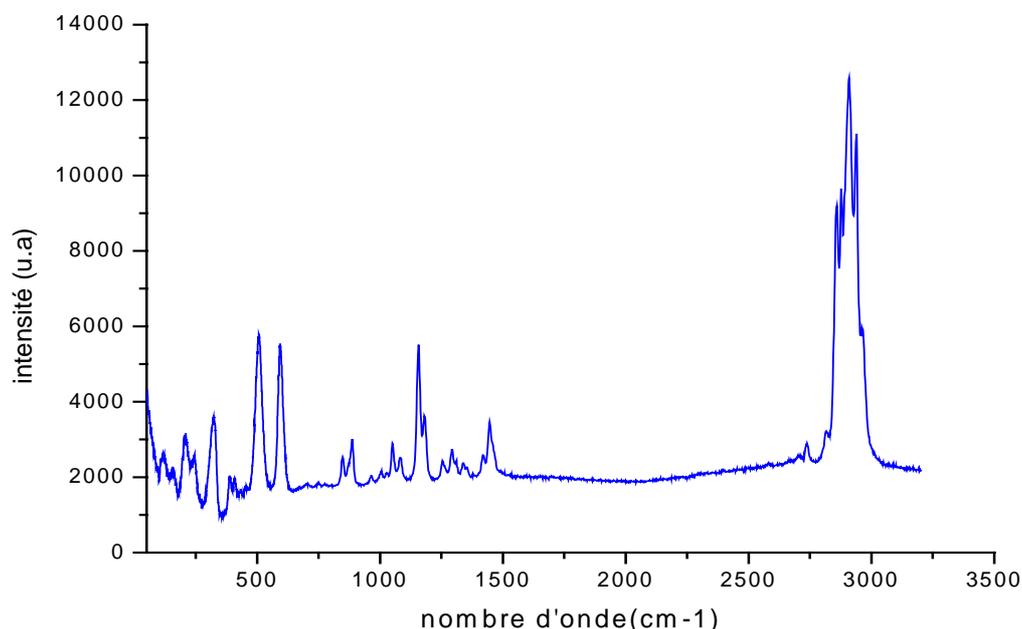


Figure 4.24 : Spectre Raman du TBT

Dans le cadre de l'étude des propriétés physico-chimique du TBT, et dans le but d'identifier chaque pic présent sur le spectre Raman et isoler les bandes caractéristiques du TBT, nous avons examiné les spectres Raman d'une série de composés de structures voisines. Les composés analysés sont le dichlorure de dibutylétain appelé aussi DBT ((C₄H₉)₂SnCl₂) et le tributyl germanium hydride ((C₄H₉)₃GeH).

La figure ci-dessous donne la formulation chimique des deux molécules.

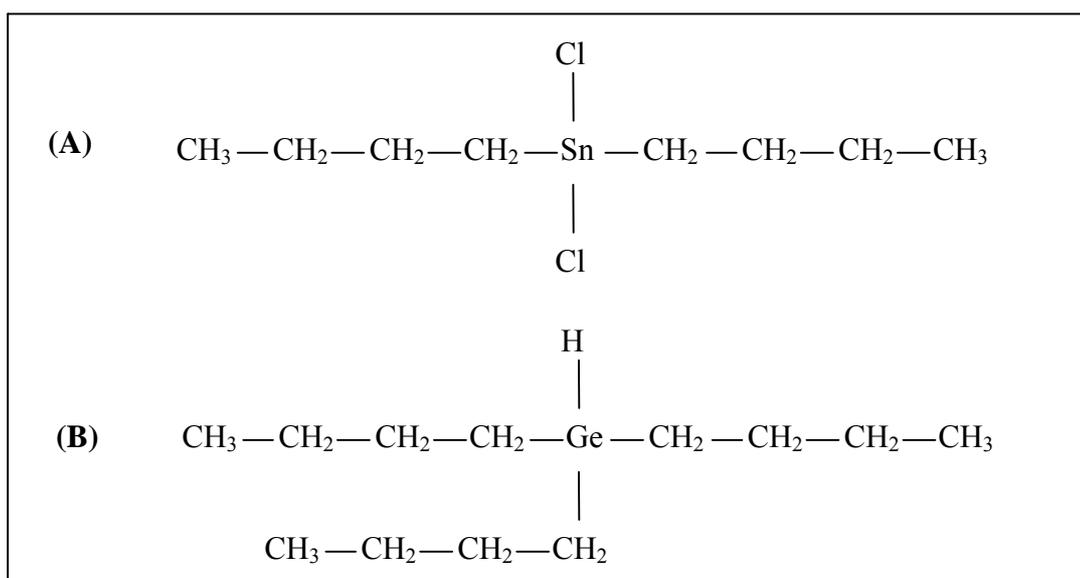


Figure 4.25 : Structure chimique des deux molécules
(A): structure du DBT, (B): structure du tributyl germanium hydride

Les trois composés contiennent le même groupement butyle ($\text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 -$). La figure 4.26 donne les spectres obtenus de ces composés. Les spectres sont mesurés dans les mêmes conditions expérimentales que pour le TBT.

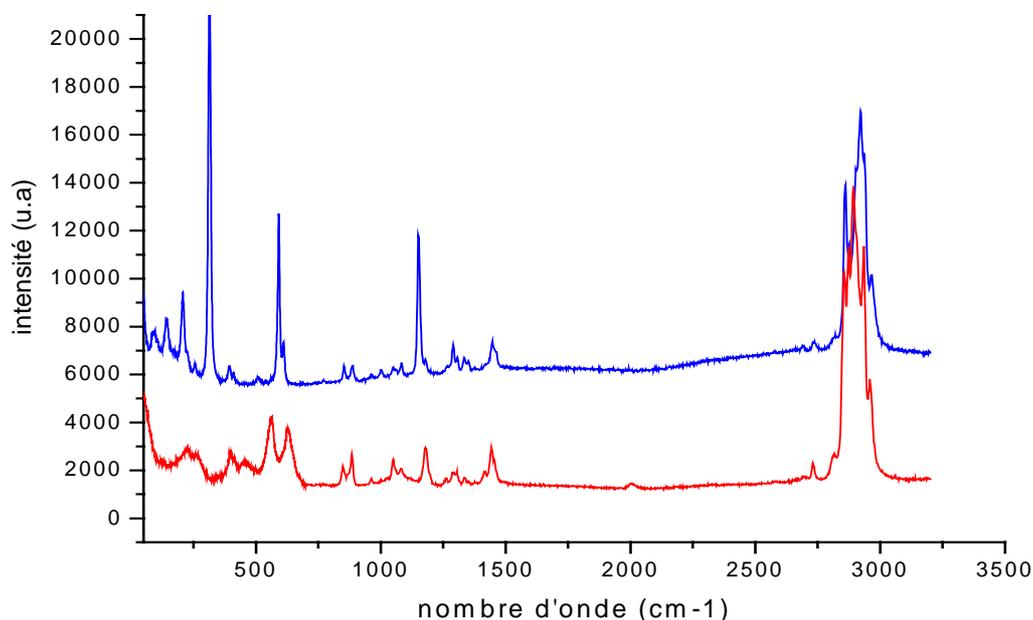


Figure 4.26 : Spectres Raman

— : spectre du DBT

— : spectre du tributyl germanium hydride

En basses fréquences, avec les trois composés, on localise des bandes de vibration communes. Ces bandes sont caractéristiques de la présence du groupement butyle dans les trois molécules. Elles sont situées entre 200 et 250 cm^{-1} et entre 390 et 494 cm^{-1} .

Les molécules du TBT et DBT sont caractérisées par la présence d'atomes d'étain et de chlore dont la masse est importante. Leur présence se manifeste donc, dans le spectre Raman, en basse fréquence. Pour le TBT, on identifie la présence de trois types de mode de vibration[32] : la vibration de déformation $\delta(\text{C}_3\text{SnCl})$ se situe à 117 cm^{-1} , la vibration $\delta_{\text{as}}(\text{SnC}_3)$ à 155 cm^{-1} et le mode de vibration intense attribué à $\nu(\text{SnCl})$ est à 324 cm^{-1} . En comparaison avec le TBT, on note l'absence de ces trois modes de vibration dans les spectres du DBT et du tributyl germanium hydride.

Dans le domaine des hautes fréquences, pour les trois composés, on note la présence des bandes intenses entre 2700 et 3000 cm^{-1} . Pour un spectre Raman, dans cette zone se situent en général les vibrations $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$, $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_3)$, $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$ et $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$ ainsi que les vibrations de déformation $\delta(\text{CH}_3)$ et $\delta(\text{CH}_2)$. Ces vibrations sont présentes dans les trois molécules avec des intensités différentes.

Le seul mode qui différentie les trois molécules est le mode à 2857 cm^{-1} , il caractérise la vibration symétrique $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2\text{-Sn})$ [33]. Ce mode est présent dans la molécule de TBT avec une intensité importante, en revanche on note son absence dans le DBT et le tributyl germanium hydride.

Le tableau suivant donne les modes de vibration identifiés sur le spectre Raman du TBT.

Composante	Nombre d'onde (cm ⁻¹)
$\delta(\text{C}_3\text{SnCl})$	117
$\delta_s + \delta_{as}(\text{SnC}_3)$	155
$\delta(\text{Butyl})$	208
$\delta(\text{Butyl})$	243
nd	309
$\nu(\text{SnCl})$	323
$\delta(\text{Butyl})$	387
$\delta(\text{Butyl})$	407
$\delta(\text{Butyl})$	431
nd	454
$\nu_s + \nu_{as}(\text{SnC}_3)$	504
$\nu_s + \nu_{as}(\text{SnC}_3)$	591
nd	2700
nd	2736
nd	2813
$\nu_s(\text{CH}_2\text{-Sn})$	2857
$\nu_s(\text{CH}_3)$	2877
nd	2907
$\nu_{as}(\text{CH}_2)$	2939
$\nu_{as}(\text{CH}_3)$	2965

Tableau 4.5 : Fréquences et attributions des bandes du TBT

ν_s : vibration de valence symétrique,
 ν_{as} : vibration de valence antisymétrique,
 δ : vibration de déformation,
 nd : non déterminée.

En conclusion, la comparaison du spectre du TBT avec celui du DBT et du tributyl germanium hydride, nous a permis d'identifier les modes de vibration spécifiques au TBT. On note les modes $\delta(\text{C}_3\text{SnCl})$, $\delta_{as}(\text{SnC}_3)$ et $\nu(\text{SnCl})$ en basses fréquences et le mode $\nu_s(\text{CH}_2\text{-Sn})$ en hautes fréquences, qui font tous intervenir l'étain.

5. Détection du TBT dans les peintures antifouling

Rappelons que nous disposons de trois peintures antifouling, une peinture verte sans TBT et deux peintures noire et grise contenant comme matière antifouling le tributylétain sous forme

de résine greffée avec du TBT (cutinox). Les concentrations en TBT sont inconnues pour les deux peintures. La figure 4.27 représente des images des trois peintures obtenues sous microscope avec un objectif de microscope $\times 50$.

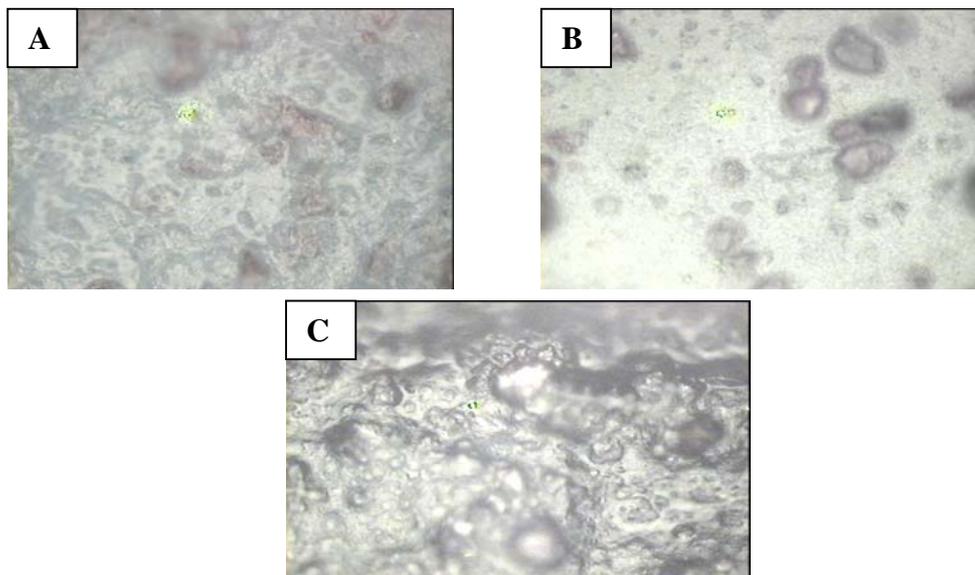


Figure 4.27 : Images des peintures sous microscope
A : peinture verte, B : peinture grise,
C : peinture noire

Les figures 4.28 et 4.29 représentent les spectres Raman obtenus avec les trois peintures, respectivement dans le domaine des basses fréquences et hautes fréquences.

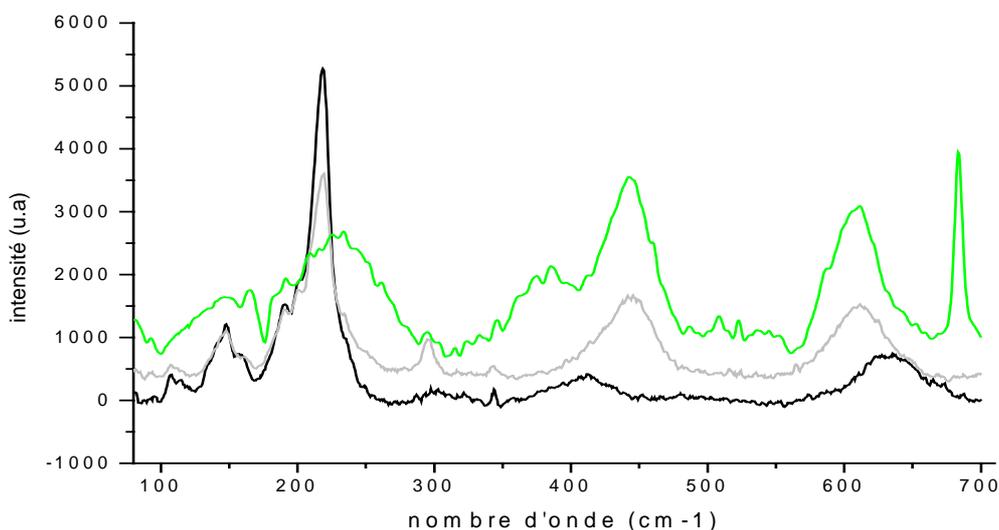


Figure 4.28 : Spectres Raman des peintures dans le domaine basses fréquences
— : Peinture grise avec TBT, — : peinture noire avec TBT,
— : Peinture verte sans TBT

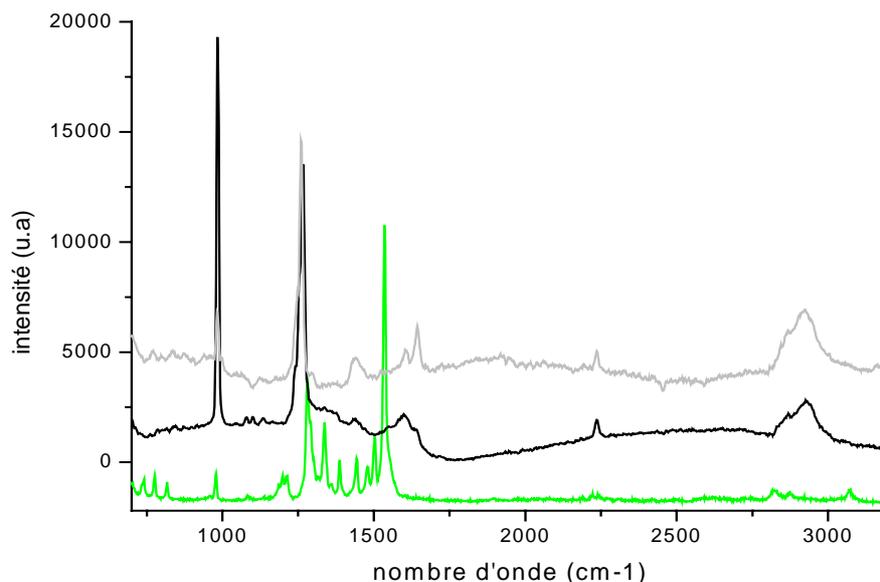


Figure 4.29 : Spectres Raman des peintures en hautes fréquences
 — : Peinture grise avec TBT, — peinture noire avec TBT,
 — : Peinture verte sans TBT

Compte tenu des bandes caractéristiques du TBT, identifiées précédemment, dans la peinture verte sans TBT, on note l'absence de ces bandes. Pour les peintures grise et noire avec TBT, on observe l'apparition des bandes en basses et hautes fréquences caractéristiques du TBT.

En basses fréquences, on trouve les deux bandes à 110 et à 150 cm^{-1} caractéristiques des modes $\delta(\text{C}_3\text{SnCl})$ et $\delta(\text{C}_3\text{Sn})$. Pour le TBT, ces deux bandes sont respectivement à 117 et 155 cm^{-1} . Ce décalage en nombre d'onde est probablement dû au fait que :

- le TBT se trouve inséré dans un environnement chimique différent par rapport à la solution,
- le passage à l'état solide implique probablement une augmentation des constantes de force et donc une diminution du nombre d'onde relatif.

Pour les bandes en hautes fréquences, au niveau des peintures grise et noire, on observe deux bandes larges. La première est à 2851 cm^{-1} pour la peinture grise et à 2859 cm^{-1} pour la noire alors que pour le TBT, on l'observe à 2857 cm^{-1} . Cette bande est absente pour la peinture verte sans TBT.

La deuxième bande se situe dans le spectre des peintures grise et noire et pour le TBT, respectivement à 2931 , 2938 et 2939 cm^{-1} .

Ces modes de vibration en hautes et basses fréquences représentent donc un indicateur de présence de TBT dans les peintures grise et noire.

6. Limite de détection de TBT dans les peintures

Afin de vérifier s'il existe une évolution spectrale en fonction de la concentration de TBT dans les peintures, nous avons étudié la peinture verte avec différentes concentrations. Nous

disposons des concentrations volumiques suivantes : 10, 20 et 40% de cutinox dans la peinture verte.

La figure 4.30 montre les spectres obtenus en basses fréquences pour les différentes concentrations de cutinox.

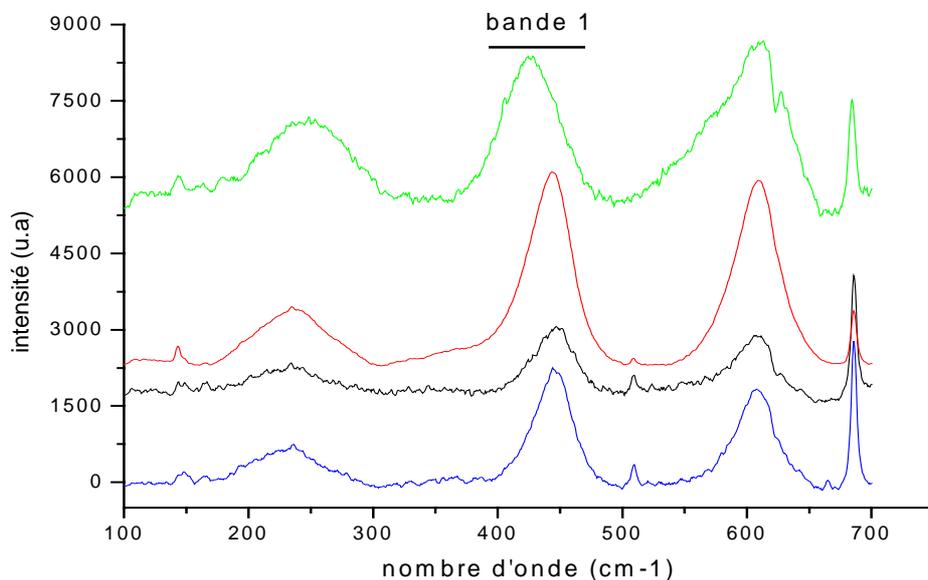


Figure 4.30 : Spectres Raman en basses fréquences

— : 40% de cutinox, — : 20 % de cutinox,
— : 10 % de cutinox, — : verte sans TBT

A partir de ces spectres, nous constatons que la seule différence observable se situe au niveau de la bande 1. On effect, on note un déplacement de cette bande vers les basses fréquences. Du fait qu'on ne connaît pas exactement la composition chimique de la peinture verte, on ne peut justifier précisément l'attribution de cette bande. La courbe de déplacement du pic à $442,8 \text{ cm}^{-1}$ est représentée sur la figure 4.31. C'est une droite avec un coefficient de corrélation de $R^2 = 0,93$.

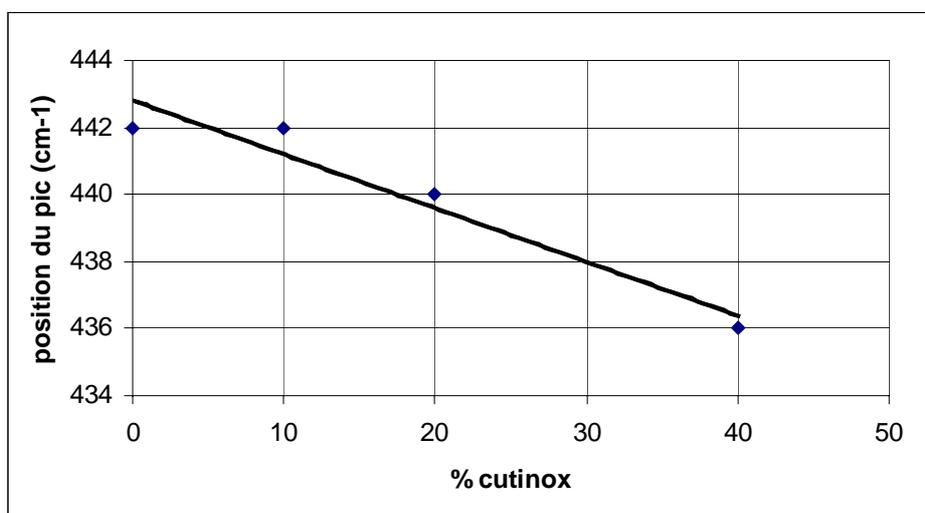


Figure 4.31 : Courbe de déplacement de la bande 1

Nous pouvons en déduire que le shift Raman dû au TBT est donné par la relation suivante :

$$\Delta\sigma(\text{cm}^{-1}) = -\frac{C(\%)}{6,25} \quad (4.7)$$

où C est la concentration en cutinox exprimée en %.

Dans le domaine des hautes fréquences, nous avons obtenus les spectres montrés sur la figure 4.32.

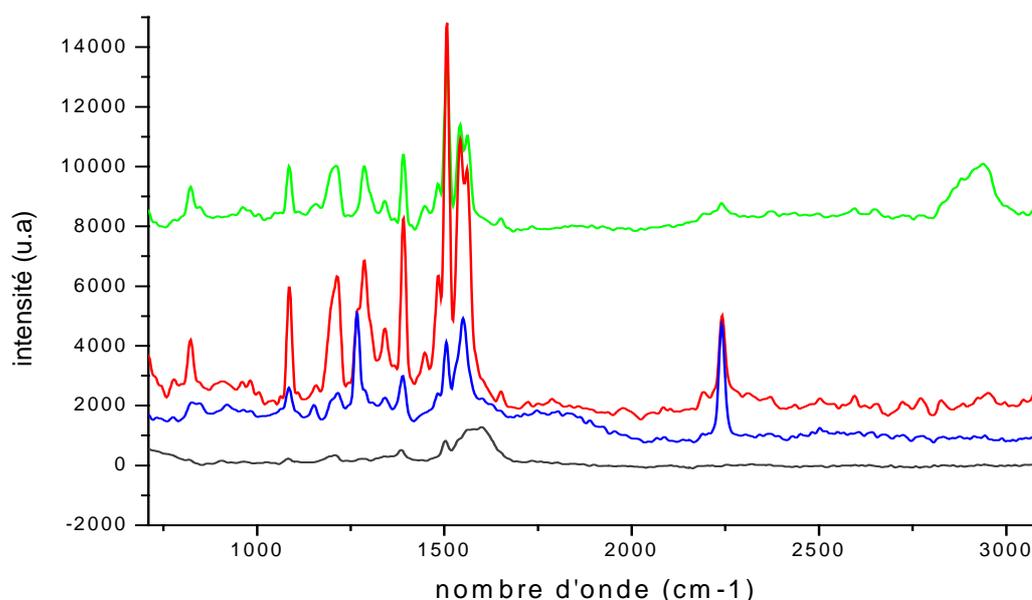


Figure 4.32 : Spectres Raman en hautes fréquences

— : 40% de cutinox, — : 20 % de cutinox,
— : 10 % de cutinox, — : verte sans TBT

D'après ces spectres, on constate que la bande caractéristique du TBT en hautes fréquences ($2850\text{-}2930\text{ cm}^{-1}$) n'est observable qu'à partir d'une concentration de 20 % du cutinox dans la peinture verte. Ce seuil de détection est élevé. Cela peut être expliqué par le fait que les peintures qui contiennent du cutinox sont âgées et qu'il se produit une dégradation du tributylétain dans les peintures avec le temps.

7. Conclusion

Ces résultats montrent que la diffusion Raman apparaît être une technique rapide d'analyse de traces de TBT dans des peintures. Cependant le seuil de détection semble relativement élevé en comparaison des résultats donnés avec Lumisens I. Le décalage fréquentiel du pic à $442,8\text{ cm}^{-1}$ offre une opportunité pour quantifier la présence de résine greffée au TBT dans les peintures.

VI. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons présenté les résultats obtenus au niveau de la caractérisation spectroscopique des bactéries ainsi que les résultats d'analyse de traces de TBT dans des peintures antifouling.

Au niveau des bactéries, nous avons montré la faisabilité et l'intérêt de cette technique pour suivre l'évolution de l'état physiologique des bactéries au cours du temps, dans une même culture (pendant les trois phases de croissance). Notre étude a été effectuée sur la bactérie *Vibrio Harveyi*.

Nous avons étudié l'effet du tributylétain sur la bactérie *E.Coli TBT3*. D'après les résultats obtenus, nous avons montré que le tributylétain a un effet observable sur les carbohydrates (sucres) et les lipides; sur un spectre Raman cela correspond à la zone spectrale 900-1200 cm^{-1} . Selon les dendrogrammes obtenus suite à la méthode de classification CHA, on note que l'état physiologique des bactéries change en fonction de la concentration de TBT auquel elles sont exposées. On trouve un effet de seuil à partir de 5 μM de TBT. Ce seuil est variable en fonction de la densité cellulaire de la suspension bactérienne.

La méthode spectroscopique a été utilisée également en tant que capteur de détection de présence de TBT dans des peintures antifouling. Nous avons montré que sur les spectres des peintures contenant du TBT, il apparaît des bandes caractéristiques du TBT en basses et hautes fréquences. Ces bandes représentent un indicateur de présence de TBT.

Avec la peinture verte et différentes concentrations en TBT, nous avons prouvé la présence du TBT avec un seuil de détection élevé en comparaison des résultats obtenus avec notre biocapteur Lumisens I.

VII. Références

1. L.P. Choo-Smith, H.G.M. Edwards, H.P. Endtz, J.M. Kros, F. Heule, H. Barr, J.S. Jr. Robinson, H.A. Bruining, G.J. Puppels, *Biopolymers (Biospectroscopy)*, **67** (2002) 1-9.
2. C.M. Krishna, G.D. Sockalingum, J. Kurien, L. Rao, L. Venteo, M. Pluot, M. Manfait, V.B. Kartha, Micro-Raman spectroscopy for optical pathology of oral squamous cell carcinoma, *Applied spectroscopy*, **58**(2004) 1128-35.
3. G.D. Sockalingum, H. Lamfarraj, A. Beljebbar, P. Pina, M. Delavenne, F. Witthuhn, P.Y. Allouch, M. Manfait, Vibrational spectroscopy as a probe to rapidly detect, identify and characterize microorganisms, *Biomedical Applications of Raman Spectroscopy*, A. Katzir, Editor, SPIE, **3608** (1999) 185-194.
4. F. Quilès, Apport des spectroscopies de vibration à l'étude des biofilms, *Journées thématiques : Apport de la spectroscopie vibrationnelle aux domaines de la biologie et de la pharmacie*, Reims, 20-21 septembre 2001.
5. G.D. Sockalingum, C. Sandt, H. Lamfarraj, M. Manfait, Caractérisation et identification des microorganismes par spectroscopie vibrationnelle, *Journées thématiques : Apport de la spectroscopie vibrationnelle aux domaines de la biologie et de la pharmacie*, Reims, 20-21 septembre 2001.
6. K.C. Schuster, I. Reese, E. Urlaub, J.R. Gapes, B. Lendl, Multidimensional information on the chemical composition of single bacterial cells by confocal Raman microspectroscopy, *Analytical Chemistry*, **72** (2000) 5529-5534.
7. K.C. Schuster, E. Urlaub, J.R. Gapes, Single cell analysis of bacteria by Raman microscopy : spectral information on the chemical composition of cells and on the heterogeneity in a culture, *Journal of Microbiological Methods*, **42** (2000) 29-38.
8. Q. Wu, Th. Hamilton, W.H. Nelson, S. Elliot, J.F. Sperry, M.Wu, UV Raman spectral intensities of E.Coli and other bacteria excited at 228,9, 244 and 248,2 nm, *Analytical Chemistry*, **73** (2001) 3432-3440.
9. W. E. Huang, R. I. Griffiths, I. P. Thompson, M. J. Bailey, A. S. Whiteley, Raman microscopic analysis of single microbial cells, *Analytical Chemistry*, **76** (2004) 4452-4458.
10. E. Consuelo, L. Diez, R. Goodacre, Characterization of microorganisms using UV resonance Raman spectroscopy and chemometrics, *Analytical Chemistry*, **76** (2004) 585-591.
11. G. J. Jr. Thomas, M. Tsuboi, Raman spectroscopy of nucleic acids and their complexes, *Advances in Biophysical Chemistry*, **3** (1993) 1-70.
12. J. C. Austin, T. Jordan, T. G. Spiro, *In Advances in Spectroscopy*, 1993, **chapter 3**, 55-127.



13. T. Miura, G.J. Jr. Thomas, Raman spectroscopy of proteins and their assemblies, *Subcellular Biochemistry*, **24** (1995) 55-99.
14. W. H. Nelson, R. Manoharan, J. F. Sperry, UV resonance Raman studies of bacteria, *Applied Spectroscopy Reviews*, **27** (1992) 67-124.
15. J. Greve, G. J. Puppels, *Advances in Spectroscopy*, 1993, **Chapter 6**, 231-267.
16. T. G. Spiro, Resonance Raman spectroscopy : a new structural probe for biological chromophores, *Accounts of Chemical Research*, **7** (1974) 339-344.
17. R. M. Jarvis, R. Goodacre, Ultra-violet resonance Raman spectroscopy for the rapid discrimination of urinary tract infection bacteria, *FEMS Microbiology Letters*, **232** (2004) 127-132.
18. P. Rosh, M. Schmitt, W. Kiefer, J. Popp, The identification of microorganisms by micro-Raman spectroscopy, *Journal of Molecular Structure*, **661-662** (2003) 363-369.
19. K. Maquelin, L. P. Choo-Smith, H. Ph. Endtz, H. A. Bruining, G. J. Puppels, Raman spectroscopic studies on bacteria, *Proceedings of SPIE*, **4161** (2000) 144-150.
20. K. Maquelin, L. P. Choo-Smith, T. V. Vreeswijk, H. Ph. Endtz, B. Smith, R. Bennett, H. A. Bruining, G. J. Puppels, Raman spectroscopic method for identification of clinically relevant microorganisms growing on solid culture medium, *Analytical Chemistry*, **72** (2000) 12-19.
21. Ch. Krafft, Th. Knetschke, A. Siegner, R. H. W. Funk, R. Salzer, Mapping of single cells by near infrared Raman microspectroscopy, *Vibrational Spectroscopy*, **32** (2003) 75-83.
22. P. C. Lee, D. Meisel, Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols, *Journal of Physical Chemistry*, **86** (1982) 3391-3395.
23. K. Nithipatikom, M. J. McCoy, S. R. Hawi, K. Nakamoto, F. Adar, W. B. Campbell, Characterization and application of Raman labels for confocal Raman microspectroscopic detection of cellular proteins in single cells, *Analytical Biochemistry*, **322** (2003) 198-207.
24. R. M. Jarvis, A. Brooker, R. Goodacre, Surface-enhanced Raman spectroscopy for bacterial discrimination utilizing a scanning electron microscope with a Raman spectroscopy interface, *Analytical Chemistry*, **76** (2004) 5198-5202.
25. L. Zeiri, B. V. Bronk, Y. Shabtai, J. Czégé, S. Efrima, Silver metal induced surface enhanced Raman of bacteria, *Colloids and Surface A*, **208** (2002) 357-362.
26. R. M. Jarvis, R. Goodacre, Discrimination of bacteria using surface-enhanced Raman spectroscopy, *Analytical Chemistry*, **76** (2004) 40-47.



27. C. H. Munro, W. E. Smith, M. Garner, J. Clarkson, P. C. White, Characterization of the surface of a citrate reduced colloid optimized for use as a substrate for surface enhanced resonance raman scattering, *Langmuir*, **11** (1995) 3712-3720.
28. E. Grew, L. Wood, J. L. Claycomb, P. A. Thompson, New biochip technology for label-free detection of pathogens and their toxins, *Journal of Microbiological Methods*, **53** (2003) 221-233.
29. G.D. Sockalingum, H. Lamfarraj, A. Beljebbar, P. Pina, M. Delavenne, F. Witthuhn, P. Allouch, M. Manfait, Vibrational spectroscopy as a probe to rapidly detect, identify and characterize microorganisms, *SPIE Conference on biomedical applications of Raman spectroscopy*, **3608** (1999) 185-194.
30. S.M. Evans, T.Leksono, P.D. McKinnell, Tributyltin Pollution : A diminishing problem following legislation limiting the use of TBT-based anti-fouling paints. *Marine pollution Bulletin*, **30** (1995) 14-21.
31. www3.uqar.quebec.ca/jpellerim/sem/02_etude_cas/peintures_antissalissures.
32. H. Geissler, H. Kriegsmann, Untersuchungen an zinnverbindungen X, die infrarot und Raman spektren der n-butylzinn-verbindungen $(n\text{C}_4\text{H}_9)_n\text{SnCl}_{4-n}$, *Journal of Organometallic Chemistry*, **11** (1968) 85-95.
33. J. Mendelsohn, A.Marchand, J. Valade, Etude par spectrographie infrarouge de composés organostanniques : Acoxytrialkylétains, Dialcoxydialkylétains et Oxyde de tributylétain, *Journal of Organometallic Chemistry*, **6** (1966) 25-44.





Conclusion générale





Les travaux présentés dans ce manuscrit ont été effectués dans le cadre du programme de recherche « Biocapteurs luminescents » qui a pour but le développement de biocapteurs bactériens luminescents pour la mesure de polluants dans le domaine de l'environnement et la détection des bactéries dans le domaine de l'industrie agroalimentaire.

Notre travail s'est déroulé en trois étapes :

1. Mise au point du biocapteur bactérien luminescent : Lumisens I

Lumisens I est un dispositif monocanal de mesure de la bioluminescence et de la densité optique. Son principe de mesure a été validé avec la bactérie naturellement luminescente *Vibrio Fischeri*. Lumisens I a été appliqué ensuite à la détection du tributylétain en utilisant la bactérie génétiquement modifiée *E.Coli TBT3* sensible à la présence de TBT. La limite de détection du TBT est faible et de l'ordre de 0,125 μM .

L'avantage de Lumisens I réside dans le fait qu'il permet une mesure, *in situ*, simultanée de la bioluminescence et de la densité cellulaire. Il mesure des concentrations de polluants biodisponibles contrairement aux mesures biochimiques habituelles. Cependant, Lumisens I présente aussi des inconvénients. En effet, sa plage d'utilisation est limitée par la formation du biofilm avec le temps lorsque la densité cellulaire est importante ($DO = 1$). La formation de ce biofilm perturbe la mesure de la densité optique.

Pour remédier à ce problème, il est souhaitable de travailler sur le ralentissement de la formation du biofilm dans le bioréacteur, en agissant sur le contrôle des paramètres biologiques, afin d'élargir la gamme de mesure de DO .

Lumisens I représente donc un outil de contrôle fiable, puissant et rapide pour des utilisateurs microbiologistes.

2. Mise au point du biocapteur luminescent multicanal : Lumisens II

Lumisens II est un dispositif multicanal de mesure de bioluminescence. Contrairement à Lumisens I, ce biocapteur permet une détection simultanée d'un ensemble de toxiques. Il utilise des bactéries immobilisées et génétiquement modifiées, chacune pouvant être sensible à la présence d'un seul polluant.

La première validation de ce biocapteur est satisfaisante.

Avec la carte MBC qui a été développée, ce biocapteur pourrait utiliser 16 bactéries aux spécificités diverses donc la détection de 16 polluants à la fois ce qui permet un gain de temps de mesure considérable. C'est un biocapteur autonome, facile à manipuler et il ne nécessite pas un personnel compétent pour effectuer des mesures.

3. Caractérisation spectroscopique des bioéléments

En parallèle avec la conception des deux biocapteurs, nous nous sommes intéressés à la caractérisation spectroscopique des bactéries. En effet, la fiabilité et la réponse des biocapteurs dépend de la biodisponibilité des toxiques mais aussi de l'état physiologique des bactéries bioluminescentes.



Notre travail a consisté à évaluer l'état physiologique des bactéries au cours du temps en fonction des trois phases de croissance. D'après les résultats obtenus, on note qu'avec la spectroscopie Raman couplée à la méthode d'analyse CHA, il serait possible de contrôler l'état physiologique des microorganismes au cours du temps et déterminer quelle composante de la bactérie pourrait varier. Nos résultats expérimentaux sont encourageants.

Ces travaux préliminaires représentent une première étape, pour des travaux futurs, qui pourraient déboucher sur l'analyse de l'état physiologique des bactéries immobilisées.

Par spectroscopie Raman, nous nous sommes intéressés à étudier l'effet du tributylétain sur la bactérie *E. coli TBT3*. Nous avons montré que le TBT réagit essentiellement sur les carbohydrates et les lipides au niveau de la bactéries. L'interprétation biochimique de ce résultat sort du cadre de cette thèse mais mérite d'être approfondi.

Ce travail pourrait être prolongé dans le but de déterminer la concentration molaire de TBT auquel une suspension bactérienne est exposée, déterminer le seuil de détection et suivre l'effet du TBT sur la physiologie de la bactérie en fonction du temps d'induction. Cela permettrait de comprendre et d'interpréter l'interaction entre toxique et bactérie dont l'explication reste à ce jour inconnue.

Dans une dernière partie de notre travail, nous avons appliqué la technique de la spectroscopie Raman pour analyser des traces de TBT dans des peintures antifouling. Nos résultats sont satisfaisants mais le seuil de détection est élevé par rapport à celui du biocapteur Lumisens I.

4. Perspectives

Notre travail de thèse pourrait être poursuivi avec une caractérisation des bactéries immobilisées par spectroscopie Raman afin d'améliorer les conditions d'immobilisation telles que durée de vie des bioéléments, viabilité des bactéries,...etc.

Etant donné que la technique Raman SERS, qui utilise des substrats en or ou en argent, permet d'obtenir des informations spectrales rapides (en quelques secondes) sur l'état physiologique des bactéries en fonction de leur environnement, il sera intéressant d'utiliser le principe de cette technique spectroscopique pour le développement d'autres biocapteurs multicanaux par fonctionnalisation de surfaces avec un SERS actif dont les antennes seraient contrôlées pour obtenir une spécificité à telle ou telle molécule.

