

# Table des matières

<b>Liste des Figures.....</b>	<b>12</b>
<b>Liste des Tableaux.....</b>	<b>14</b>
<b>Glossaire.....</b>	<b>17</b>
<b>Introduction Générale.....</b>	<b>19</b>
<b>CHAPITRE I : Etude Bibliographique.....</b>	<b>25</b>
<b>I.1. Typologie de la Matière Organique Dissoute.....</b>	<b>26</b>
I.1.1. Typologie selon la composition .....	26
I.1.2. Typologie selon la réactivité .....	28
<b>I.2. Caractérisation de la Matière Organique Dissoute .....</b>	<b>29</b>
I.2.1. Caractérisation physico-chimique .....	30
I.2.1.1. Techniques de séparation par taille .....	30
I.2.1.2. Techniques de séparation par charge.....	32
I.2.1.3. Techniques de séparation par hydrophobicité .....	32
I.2.2. Caractérisation fonctionnelle .....	34
I.2.2.1. Spectroscopie d'absorbance UV/Vis.....	35
I.2.2.2. Spectroscopie Infrarouge.....	36
I.2.2.3. Spectroscopie de fluorescence .....	37
I.2.2.4. Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire.....	39
I.2.3. Caractérisation structurelle .....	40
I.2.4. Caractérisation élémentaire .....	41
<b>I.3. Groupements d'intérêt environnemental .....</b>	<b>41</b>
I.3.1. Amines primaires et acides aminés .....	41
I.3.2. Thiols .....	43
I.3.3. Acides carboxyliques .....	44
I.3.4. Méthodes classiques de détection .....	45
I.3.4.1. Titration acido-basique.....	45
I.3.4.2. Techniques chromatographiques .....	46
I.3.5. Méthodes alternatives .....	47
<b>CHAPITRE II : Développement Méthodologique.....</b>	<b>50</b>
<b>II.1. La spectrofluorimétrie UV – visible : Principe.....</b>	<b>51</b>
II.1.1. La fluorescence.....	52
II.1.2. La phosphorescence.....	52
<b>II.2. Exploitation analytique de la spectrofluorimétrie.....</b>	<b>53</b>
II.2.1. Facteurs internes .....	54
II.2.2. Facteurs externes .....	54
<b>II.3. La dérivation par fluorescence : Principe.....</b>	<b>55</b>
<b>II.4. Choix des réactifs pour la dérivation et la détection par fluorescence des groupements fonctionnels .....</b>	<b>56</b>
II.4.1. Groupement amine (-NH <sub>2</sub> ) .....	57
II.4.2. Groupement thiol (-RSH) .....	59
II.4.2.1. Thiols réduits .....	59
II.4.2.1.1. Thiols réduits totaux.....	59
II.4.2.1.2. Thiols réduits individuels .....	61
II.4.2.2. Réduction des thiols oxydés.....	64
II.4.2.2.1. Les hydrures .....	65
II.4.2.2.2. Les thiols .....	65
II.4.2.2.3. Les phosphines .....	66
II.4.2.2.4. Les cyanures et les sulfites.....	67
II.4.3 Groupement carboxylique (-COOH) .....	67

<b>II.5. Méthodes d'optimisation .....</b>	<b>69</b>
II.5.1. Plan de criblage .....	69
II.5.2. Plan d'expérience .....	70
<b>II.6. Introduction aux techniques d'automatisation .....</b>	<b>72</b>
II.6.1. Technique d'analyse en microplaque .....	73
II.6.1.1. Généralités sur la technique en microplaque .....	73
II.6.2. Technique d'analyse en flux .....	75
II.6.2.1. Généralités sur les techniques en flux .....	75
<b>II.7. Matériels et Méthodes.....</b>	<b>84</b>
II.7.1. Matériels .....	84
II.7.1.1. Matériel pour les expériences en microplaques. ....	84
II.7.1.1.1. Microplaques.....	84
II.7.1.1.2. Instrument de mesure de fluorescence pour microplaques.....	84
II.7.1.2. Matériel pour les expériences d'analyse en flux. ....	84
II.7.1.2.1. Système d'analyse en flux.....	84
II.7.1.2.2. Instrument de mesure de fluorescence pour l'analyse en flux.....	85
II.7.2. Réactifs .....	86
II.7.3. Méthodes et procédures .....	87
II.7.3.1. Amines primaires et acides aminés .....	87
II.7.3.1.1. Méthode .....	87
II.7.3.1.2. Procédure .....	88
II.7.3.2. Thiols .....	89
II.7.3.2.1. Méthode .....	89
II.7.3.2.2. Procédure .....	91
II.7.3.2.3. Etape de réduction.....	91
II.7.3.2.4. Etape de dérivation.....	92
II.7.3.3. Acides carboxyliques à chaîne courte .....	92
II.7.3.3.1. Méthode .....	92
<b>CHAPITRE III : Résultats et Discussions.....</b>	<b>94</b>
<b>III.1. Détermination des amines primaires et acides aminés par automatisation en microplaque avec détection par fluorescence .....</b>	<b>95</b>
III.1.1. Présentation des paramètres influençant la dérivation et la détection des composés aminés .....	95
III.1.2. Etude de sélectivité.....	97
III.1.3. Etude des interférences.....	98
III.1.4. Caractéristiques opérationnelles de la méthode pour la détection de composés aminés et de l'ammonium. ....	99
III.1.5. Caractéristiques analytiques .....	104
III.1.6. Validation de la méthode .....	106
III.1.6.1. Validation de la procédure de dosage des composés aminés .....	106
III.1.6.2. Validation de la procédure de dosage de $\text{NH}_4^+$ .....	108
III.1.7. Conclusion.....	110
<b>III.2. Mise au point d'un kit microplaque pour la détection fluorimétrique des thiols. ....</b>	<b>111</b>
III.2.1. Présentation des paramètres influençant la dérivation et la détection des thiols. ....	111
III.2.1.1. Optimisation de l'étape de dérivation.....	111
III.2.1.1.1. Plan de criblage.....	111
III.2.1.1.2. Plan d'expériences .....	116
III.2.1.1.2.1. Effet du pourcentage de méthanol.....	120
III.2.1.1.2.2. Effet de la concentration en aminoéthanol .....	121
III.2.1.1.3. Désirabilité.....	122
III.2.1.2. Optimisation de l'étape de réduction.....	123
III.2.2. Détermination des caractéristiques analytiques de la détection fluorimétrique.....	126
III.2.2.1. Limite de détection et limite de quantification .....	127
III.2.2.2. Etude des interférences.....	128
III.2.3. Validation de la méthode.....	133
III.2.3.1. Thiols réduits .....	133
III.2.3.1.1. Echantillons de sols et composts.....	134
III.2.3.1.2. Echantillons de station d'épuration.....	136

III.2.3.2. Thiols oxydés.....	138
III.2.4. Conclusion.....	139
<b>III.3. Détermination des acides gras volatils par automatisation en flux avec détection par fluorescence.....</b>	<b>140</b>
III.3.1. Analyse en microplaque .....	140
III.3.2. Analyse en Flux.....	140
III.3.2.1. Automate développé.....	140
III.3.2.2. Présentation et optimisation des paramètres influençant la dérivation en flux des acides gras volatils .....	144
III.3.2.2.1. Optimisation de l'étape d'activation .....	144
III.3.2.2.2. Optimisation de l'étape d'amidation.....	146
III.3.2.2.3. Optimisation de l'étape d'extraction.....	147
III.3.2.2.4. Influence du débit d'extraction .....	147
III.3.2.3. Caractéristiques analytiques .....	149
III.3.2.3.1. Limites de détection et limites de quantification .....	150
III.3.2.3.2. Sélectivité .....	150
III.3.2.3.3. Interférences .....	152
III.3.2.4. Validation .....	153
III.3.2.5. Conclusion.....	154
<b>Conclusion Générale.....</b>	<b>156</b>
<b>Références Bibliographiques.....</b>	<b>161</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>178</b>
➤ Annexe 1 : Limites de qualité des eaux brutes de toutes origines utilisées pour la production d'eau destinée à la consommation humaine, à l'exclusion des eaux de source conditionnées et des eaux minérales naturelles	179
➤ Annexe 2 : Teneurs limites en éléments traces métalliques et composés organiques dans les boues	180
➤ Annexe 3 : Liste des substances prioritaires à surveiller en sortie de STEP	181
➤ Annexe 4 : Liste des polluants soumis à déclaration pour les STEP	182
➤ Annexe 5 : Massifs 3D à considérer lors de l'étude de la MOD par spectrofluorescence	183
➤ Annexe 6 : Définition et calcul des limites de détection (LD) et de quantification (LQ) selon la procédure proposée par AFNOR	184
➤ Annexe 7 : Liste des publications et brevets issus des travaux de recherche	186

## Liste des Figures

<i>Figure 1: Rôles et impacts écologiques de la MOD</i>	22
<i>Figure 2 : Evolution de la matière organique</i>	28
<i>Figure 3: Fractionnement de la matière organique dans l'environnement</i>	31
<i>Figure 4 : Schéma du cycle du soufre</i>	43
<i>Figure 5: Diagramme de Jablonski</i>	52
<i>Figure 6: Réaction de l'OPA en présence d'un thiol pour la détection d'une amine primaire ou des acides aminés</i>	57
<i>Figure 7 : Réactifs analogues à l'OPA utilisés pour la dérivation de composés aminés</i>	58
<i>Figure 8 : Réaction de la fluoescamine avec une amine primaire</i>	59
<i>Figure 9: Détection de thiols par le réactif d'Ellman (Acide 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoïque)</i>	60
<i>Figure 10 : Formation de la thiopyridone en présence de composés thiols et de dithiodipyridine</i>	60
<i>Figure 11: Réactifs utilisés pour la dérivation de thiols et leur détection par fluorescence</i>	62
<i>Figure 12 : Schéma de réaction de l'OPA en présence du glutathion</i>	63
<i>Figure 13: Formation de ponts disulfure</i>	64
<i>Figure 14 : Réduction de disulfures avec le Dithiothréitol (DTT)</i>	66
<i>Figure 15 : Mécanisme de réaction des trialkylphosphines</i>	66
<i>Figure 16 : Les principaux types de réactifs pour la dérivation de l'acide carboxylique</i>	68
<i>Figure 17 : Les quatre géométries de fonds de puits disponibles sur les microplaques</i>	74
<i>Figure 18: Fonctionnement d'un lecteur microplaque</i>	75
<i>Figure 19 : Liste non exhaustive des différents modules utilisés pour la mise en flux, l'injection, le mélange et la détection</i>	76
<i>Figure 20 : Exemple d'analyse en flux segmenté (SFA)</i>	78
<i>Figure 21 : Exemple d'analyse avec injection en flux (FIA)</i>	79
<i>Figure 22: Exemple d'analyse en flux multi-commutation (MCFA)</i>	80
<i>Figure 23: Exemple d'analyse par injection séquentielle (SIA)</i>	81
<i>Figure 24: Exemple d'analyse en flux multiseringue (MSFIA)</i>	82
<i>Figure 25: Exemple d'analyse en flux multi-pompes (MPFS)</i>	83
<i>Figure 26: Réaction de dérivation des amines avec l'OPA en présence d'un thiol</i>	87
<i>Figure 27 : Réponse spectrale du dérivé fluorescent à <math>\lambda_{em}= 455\text{ nm}</math> (<math>\lambda_{exc}= 335\text{ nm}</math>)</i>	88
<i>Figure 28: Procédure en microplaque pour la détection d'amines et d'ammonium</i>	89
<i>Figure 29: Réaction de dérivation des thiols avec l'OPA en présence d'une amine primaire</i>	90
<i>Figure 30 : Réponse spectrale du dérivé fluorescent à <math>\lambda_{em}= 445\text{ nm}</math> (<math>\lambda_{exc}= 335\text{ nm}</math>)</i>	91

Figure 31 : Procédure en microplaque pour la détection de thiols totaux	92
Figure 32. Activation du carbone portant le groupement -OH de l'acide acétique avec le N'-(3-diméthylaminopropyl)-N-éthylcarbodiimide (EDC)	93
Figure 33 : Dérivation avec EDAN (N-(1-naphtyl) éthylène diamine) de l'acide acétique pré-activé	94
Figure 34 : Réponse spectrale du dérivé fluorescent à $\lambda_{em}= 395\text{ nm}$ ( $\lambda_{exc}= 335\text{ nm}$ )	94
Figure 35 : Résultats du criblage effectué afin d'étudier les facteurs pouvant influencer la formation et la stabilité du dérivé isoindole pour chaque thiol analysé.	97
Figure 36: Corrélation entre les valeurs MPA et NAC obtenus après l'étude de criblage	97
Figure 37 : Fluorescence des isoindoles formés par la dérivation (OPA-NAC) de différents composés aminés	98
Figure 38: Cinétique de stabilité du dérivé isoindole en présence de $\text{NH}_4^+$ et de glycine à $\lambda_{em} = 485\text{ nm}$ ( $\lambda_{ex}= 415\text{ nm}$ )	101
Figure 39: Stabilité de fluorescence du dérivé ammonium formé à $\lambda_{em}= 485\text{ nm}$ . [OPA] = 3 mmol.L <sup>-1</sup> , [NAC] = 3 mmol.L <sup>-1</sup> , pH : 10,8	102
Figure 40 : Influence du pourcentage de méthanol dans la stabilité du dérivé-ammonium à $\lambda_{em}=485\text{nm}$ . [OPA] = 3 mmol.L <sup>-1</sup> , [NAC] = 3 mmol.L <sup>-1</sup> , pH : 10,8	103
Figure 41: Cinétique de stabilité du dérivé isoindole en présence de $\text{NH}_4^+$ et glycine à $\lambda_{em} = 455\text{ nm}$ ( $\lambda_{ex}= 335\text{ nm}$ )	104
Figure 42: Evolution des droits d'étalonnage du dérivé ammonium à $\lambda_{em}= 455\text{ nm}$ ( $\lambda_{em} = 335\text{nm}$ ) [OPA] = 3 mmol.L <sup>-1</sup> , [NAC] = 3 mmol.L <sup>-1</sup> , pH = 10,8	104
Figure 43 : Courbe d'étalonnage de la glycine au bout de 3 minutes de réaction à $\lambda_{em} = 455\text{nm}$ ( $\lambda_{ex}= 335\text{ nm}$ )	105
Figure 44: Courbe de linéarité de l'ammonium au bout de 3 minutes de réaction à $\lambda_{em} = 455\text{ nm}$ ( $\lambda_{ex}= 335\text{ nm}$ )	106
Figure 45: Courbe d'étalonnage de l'ammonium au bout de 6 minutes de réaction à $\lambda_{em} = 485\text{ nm}$ ( $\lambda_{ex}= 415\text{ nm}$ )	107
Figure 46 : Droite de corrélation entre les résultats obtenus par la méthode proposée et ceux obtenus par chromatographie ionique	110
Figure 47: Comportement de réponses obtenues après le plan de criblage. A. Réponses normales. B. Réponses type Logarithme	114
Figure 48: Etude graphique des effets des facteurs influents, lors du plan de criblage	116
Figure 49 : Influence du méthanol sur la stabilité et l'intensité de fluorescence du dérivé isoindole de la cystéine	117
Figure 50 : Corrélation entre les réponses (intensités de fluorescence) : $Y_5$ et $Y_{10}$ (A) ; $Y_5$ et $Y_{15}$ (B) ; $Y_5$ et $Y_{20}$ (C) ; $Y_5$ et $Y_{25}$ (D) ; $Y_5$ et $Y_{30}$ (E).	120
Figure 51 : Courbes de niveau (A) et de surface de réponse (B) montrant la variation de la réponse $Y_{10}$ (Intensité de fluorescence) en fonction de [OPA] ( $X_1$ ) et le pourcentage de méthanol ( $X_2$ ).	121
Figure 52 : Courbes de niveau (A) et de surface de réponse (B) montrant la variation de la réponse $Y_{10}$ (Intensité de fluorescence) en fonction de [OPA] ( $X_1$ ) et [AE] ( $X_3$ )	122

Figure 53 : Courbes de niveau (A) et de surface de réponse (B) montrant la variation de la réponse $Y_{10}$ (Intensité de fluorescence) en fonction de [%MeOH] ( $X_2$ ) et [AE] ( $X_3$ )	124
Figure 54 : Courbes d'isoréponses de la fonction de désirabilité. (A) concentration en OPA, concentration en aminoéthanol avec 43% MeOH (facteur fixe). (B) Concentration en OPA et %MeOH avec [AE] de 14 mmol.L <sup>-1</sup> (facteur fixe)	124
Figure 55: Stabilité du dérivé fluorescent après réduction de CSSC avec TBP préparé dans les différents solvants testés	126
Figure 56: Influence du pH sur dans l'étape de réduction à : $\lambda_{em} = 445$ nm ( $\lambda_{ex} = 335$ nm), [OPA]= 50 $\mu$ mol.L <sup>-1</sup> , [AE]= 13,5 $\mu$ mol.L <sup>-1</sup> , MeOH= 43%	127
Figure 57 : Cinétiques de réduction de CSSC à différents concentrations de TBP à $\lambda_{em} = 445$ nm ( $\lambda_{ex} = 335$ nm), pH= 9.5, [OPA]= 50 $\mu$ mol.L <sup>-1</sup> , [AE]= 13,5 mmol.L <sup>-1</sup> , MeOH= 43%	127
Figure 58: Corrélation entre l'intensité de fluorescence et les concentrations en équivalents de cystéine à $\lambda_{em} = 445$ nm ( $\lambda_{ex} = 335$ nm), pH= 9.5, [OPA]= 50 $\mu$ mol.L <sup>-1</sup> , [AE]= 13,5 mmol.L <sup>-1</sup> , MeOH= 43%, [TBP]= 200 mmol.L <sup>-1</sup>	129
Figure 59: Effet du cuivre (10 mg.L <sup>-1</sup> ) sur la détection de la cystéine (2 $\mu$ mol.L <sup>-1</sup> ) à $\lambda_{em} = 445$ nm ( $\lambda_{ex} = 335$ nm), pH= 9.5, [OPA]= 50 $\mu$ mol.L <sup>-1</sup> , [AE]= 13,5 mmol.L <sup>-1</sup> , MeOH= 43%, [EDTA]= 0,1 mol.L <sup>-1</sup>	130
Figure 60 : Réduction du complexe Cuivre-thiol à : $\lambda_{em} = 445$ nm ( $\lambda_{ex} = 335$ nm), pH (réduction)= 8,2, [TBP]= 200 mmol.L <sup>-1</sup> , [EDTA]= 0,1 mol.L <sup>-1</sup> , pH (dérivation) = 9.5, [OPA]= 50 $\mu$ mol.L <sup>-1</sup> , [AE]= 13,5 mmol.L <sup>-1</sup> , MeOH= 43%.	131
Figure 61: Courbe d'étalonnage de la cystéine avec la méthode d'Ellman	134
Figure 62: Méthode des ajouts dosés appliquées aux échantillons de sols et compost (OPA-AE)	135
Figure 63 : Méthode des ajouts dosés appliquées aux échantillons de sols et compost (Ellman)	136
Figure 64: Méthode des ajouts dosés appliquée aux échantillons de boues de station d'épuration (OPA-AE)	137
Figure 65 : Méthode des ajouts dosés appliquées aux échantillons de boues de station d'épuration (Ellman).	138
Figure 66 : Représentation schématique du système d'analyse en flux pour la détection des acides gras volatils	141
Figure 67: Variation de l'intensité de fluorescence en fonction du pH dans l'étape d'activation	144
Figure 68: Optimisation du temps d'activation dans le système en flux	145
Figure 69: Optimisation du pH de l'étape d'amidation avec l'EDAN	146
Figure 70: Optimisation du temps de réaction de dérivation avec une solution standard de 10 mg.L <sup>-1</sup> d'acide acétique.	147
Figure 71 : Influence du débit sur l'intensité de fluorescence et le temps d'extraction du dérivé amide formé	148
Figure 72: Réponse du système d'analyse MSFIA-MPFS proposé avec 100 mg.L <sup>-1</sup> d'acide acétique	149

*Figure 73: Corrélation entre l'intensité de fluorescence et les concentrations en acide acétique* 150

*Figure 74: Droite de corrélation établie entre les résultats obtenus par la procédure en flux et ceux obtenus par HPIC pour le dosage des AGV.* 154

Rapport-Gratuit.com

## Liste des Tableaux

<i>Tableau 1: Produits de dégradation de la matière organique fraîche (Sigg et al., 2001).....</i>	<i>26</i>
<i>Tableau 2: Substances trouvées dans les fractions spécifiques de la MOD (Qualls et Haines, 1991).....</i>	<i>33</i>
<i>Tableau 3: Principales techniques de caractérisation fonctionnelle de la MOD (d'après Abbt-Braun et al., 2004).....</i>	<i>34</i>
<i>Tableau 4 : Principales longueurs d'onde et rapports utilisés dans la caractérisation de la matière organique .....</i>	<i>35</i>
<i>Tableau 5: Bandes d'absorption spécifiques des structures organiques en spectroscopie IR présentes dans les extraits de MOD (Croué et al., 2000 ; Dignac et al., 2001 ; Field et al., 1992 ; Leenheer et Rostad, 2004) .....</i>	<i>36</i>
<i>Tableau 6: Types de fluorophores identifiés par spectroscopie de fluorescence en fonction de leur position sur un spectre tridimensionnel (Coble, 1996 ; Hudson et al., 2007 ; Parlanti et al., 2000) .....</i>	<i>39</i>
<i>Tableau 7 : Déplacements chimiques des composés pouvant être observées par RMN <sup>13</sup>C .....</i>	<i>40</i>
<i>Tableau 8 : Références des produits utilisés pour la constitution des réactifs.....</i>	<i>86</i>
<i>Tableau 9: Domaine expérimental pour le criblage des facteurs influençant la dérivation des amines avec l'OPA.....</i>	<i>95</i>
<i>Tableau 10 : Effets de différents éléments interférents sur la fluorescence du dérivé isoindole. ([OPA] = 1,5 mmol.L<sup>-1</sup>, [NAC]=3 mmol.L<sup>-1</sup>, pH=9,5).....</i>	<i>98</i>
<i>Tableau 11 : Limites de détection et quantification de la procédure fluorimétrique pour la détermination de composés aminés et ammonium à <math>\lambda_{em} = 455nm</math> (<math>\lambda_{ex} = 335nm</math>). [OPA]= 3mmol.L<sup>-1</sup>, [NAC]= 3mmol.L<sup>-1</sup>, pH=10,8.....</i>	<i>105</i>
<i>Tableau 12 : Caractéristiques analytiques de la procédure de détermination de l'ammonium à <math>\lambda_{em} = 485nm</math> (<math>\lambda_{ex} = 415nm</math>).....</i>	<i>106</i>
<i>Tableau 13: Détermination de l'ammonium dans différents échantillons à <math>\lambda_{em} = 485 nm</math> (<math>\lambda_{ex} = 415 nm</math>).....</i>	<i>107</i>
<i>Tableau 14 : Détermination des composés aminés dans différents échantillons à <math>\lambda_{em} = 455 nm</math> (<math>\lambda_{ex} = 335 nm</math>).....</i>	<i>108</i>
<i>Tableau 15 : Domaine expérimental du plan de criblage pour l'analyse de facteurs influent la dérivation de thiols.....</i>	<i>112</i>
<i>Tableau 16: Réponses expérimentales étudiées lors du criblage des facteurs influençant la dérivation des thiols avec l'OPA.....</i>	<i>113</i>



Tableau 17: Plan d'expérience (matrice de Doehlert) mis en œuvre afin de déterminer les valeurs optimales des facteurs influençant la stabilité et l'intensité de fluorescence des dérivés isoindoles des composés thiols.....	118
Tableau 18: Limites de détection et quantification de la procédure fluorimétrique à $\lambda_{em}= 445$ nm ( $\lambda_{ex}= 335$ nm), pH= 9.5, [OPA]= 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , [AE]= 13,5 $\text{mmol.L}^{-1}$ , MeOH= 43%, [TBP]= 200 $\text{mmol.L}^{-1}$ .....	127
Tableau 19 : Effets de différents éléments sur la fluorescence du dérivé isoindole à $\lambda_{em}= 445$ nm ( $\lambda_{ex}= 335\text{nm}$ ), pH= 9.5, [OPA]= 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , [AE]= 13,5 $\text{mmol.L}^{-1}$ , MeOH= 43%, [TBP]= 200 $\text{mmol.L}^{-1}$ .....	129
Tableau 20: Effets de différents éléments sur la fluorescence du dérivé isoindole en présence et sans présence du TBP et EDTA. $\lambda_{em}= 445\text{nm}$ ( $\lambda_{ex}= 335\text{nm}$ ), pH (réduction)= 8,2, [TBP]= 200 $\text{mmol.L}^{-1}$ , [EDTA]= 0,1 $\text{mol.L}^{-1}$ , pH (dérivation)= 9.5, [OPA]= 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , [AE]= 13,5 $\text{mmol.L}^{-1}$ , MeOH= 43%.....	132
Tableau 21 : Caractéristiques analytiques de la méthode Ellman .....	133
Tableau 22 : Comparaison des méthodes de détection des thiols.....	135
Tableau 23: Comparaison des méthodes de détection de thiols .....	137
Tableau 24: Validation par ajouts dosés de la procédure pour la détection de thiols totaux. ....	139
Tableau 25 : Procédure automatisée de détermination des acides gras volatils.....	143
Tableau 26 : Réponses de fluorescence de divers acides carboxyliques après dérivation (% Intensité de fluorescence = (Intensité de fluorescence de l'acide carboxylique cible / Intensité de fluorescence d'une solution d'acide acétique à 50 $\text{mgL}^{-1}$ ) $\times$ 100). Tous les acides carboxyliques ont été testés à une concentration de 50 $\text{mgL}^{-1}$ .....	151
Tableau 27 : Concentration maximale tolérable de composés organiques et minéraux pour des solutions standards de 50 $\text{mg.L}^{-1}$ d'acide acétique .....	153

## Abréviations

3MPA:	Acide 3-Mercaptopropionique
AGV :	Acide Gras Volatils
AE :	Aminoéthanol
BA:	Butylamine
Cys:	Cystéine
DMF :	<i>N,N</i> -diméthylformamide
EDC :	<i>N</i> -(3-diméthylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethylcarbodiimide).
EDTA:	Acide éthylène diamine tetra acétique
GSH:	Glutathion
GSSG:	Glutathion oxydée
HOBT :	<i>N</i> -Hydroxybenzotriazole
MeOH :	Méthanol
ME:	Mercaptoéthanol
MO :	Matière Organique
MOD :	Matière Organique Dissoute
MTBE :	Méthyltert-butyléther
OPA :	<i>O</i> -phtaldialdehyde
NAC:	<i>N</i> -Acétyl-L-Cystéine
NALL:	<i>N</i> -Acétyl-L-Lysine
MPFS:	Analyse en flux multi-pompes
MSFIA:	Analyse par injection en flux multi seringues
RMN :	Résonance Magnétique Nucléaire
RSH <sub>oxyés</sub> :	Thiols oxydés
RSH <sub>totaux</sub> :	Thiols totaux
RSH <sub>réduits</sub> :	Thiols réduits
SH :	Substances Humiques
STEP :	Station d'épuration
TBP:	Tributylphosphine
UV-Vis :	Ultra violet-visible

## Glossaire

Abiotique : En écologie, les facteurs abiotiques sont des paramètres physico-chimiques qui ont une influence sur un écosystème donné. Ils regroupent notamment les facteurs édaphiques d'un sol (structure, granulométrie, teneur en humus, salinité, ...), les facteurs climatiques (température, teneur en eau, lumière, ...), les facteurs chimiques (teneurs en éléments minéraux et en gaz), les facteurs topographiques (altitude, exposition, pente, ...)

Capacité d'échange ionique : Somme des ions échangeables (incluant  $H^+$ ). Elle détermine la faculté d'un sédiment à retenir des cations ou des anions par échange ionique et est exprimée en milliéquivalent (meg)/100g de matériaux. La capacité d'échange cationique (CEC) est de loin supérieure à la capacité d'échange anionique.

Complexe (ou composé de coordination ou complexe métallique) : Structure (molécule ou ion) formée à partir d'un atome ou d'un ion central, et des atomes ou des molécules qui l'entourent.

Le nombre de liaisons formées par l'atome central est le nombre de coordination. Le ligand monodenté se fixe à l'atome central par une position, lorsque qu'il se fixe à l'atome central par deux (ou plusieurs) positions, on parle de ligand bidenté (ou polydenté). Les complexes formés avec des ligands polydentés sont appelés des chélates.

Coefficient de partage octanol-eau ( $K_{oe}$ ) : Rapport entre la concentration à l'équilibre d'une substance chimique dans l'octanol et la concentration en cette même substance dans l'eau. L'octanol représente le comportement des lipides. Plus ce coefficient est élevé, plus le composé aura tendance à s'accumuler dans les êtres vivants.

Ecosystème : Communauté (ou association fonctionnelle) d'êtres vivants en interaction avec un environnement qui constitue son biotope. Les facteurs de l'environnement qui interviennent dans un écosystème peuvent être de nature physico-chimique (abiotiques) ou d'origine biologique (biotiques). Par exemple, on peut citer comme écosystèmes classiques : une forêt, une rivière, une lagune, un agrosystème ou une ville, jusqu'à des écosystèmes totalement artificiels, tels une station d'épuration, un hôpital, un atelier de production industrielle (définition extraite du Programme 2009 « Contaminants, Environnement, Santé » de l'Agence Nationale de la Recherche).

Humus : Ensemble des résidus végétaux et animaux plus ou moins décomposés à la surface du sol. L'acide humique et l'acide fulvique sont les fractions les plus importantes de l'humus.

Ligands : Ion, atome ou groupe fonctionnel qui est lié de façon non covalente sur un ou plusieurs atomes ou ions centraux, un récepteur ou à un site spécifique. Les ligands inorganiques qui complexent les ions métalliques sont les anions les plus courants :  $\text{HO}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{CN}^-$ , ... De très nombreux ligands organiques peuvent aussi complexer les ions métalliques : ils ont principalement comme origine les activités biologiques comme les acides aminés, l'acide acétique, le phénol, les protéines, les glucides, les acides humiques et fulviques... (Sigg *et al.*, 2001). Les complexes formés entre les ions métalliques et les ligands inorganiques sont beaucoup moins stables que ceux formés avec les ligands organiques (Blanchard, 2000).

Sorption : Terme général qui est utilisé pour désigner tout processus à l'interface conduisant à un changement de phase (solide-liquide) du soluté ou à la transformation d'une surface de par la présence du soluté ou de son environnement (Sigg *et al.*, 2001). D'une manière générale, la sorption peut être définie comme la réaction faisant intervenir un ion en solution avec un groupe fonctionnel à la surface d'un solide (Audry, 2003). Les phénomènes de sorption-désorption sont essentiels car ils englobent tous les mécanismes d'interaction solide-liquide. Dans le domaine de l'hydrogéologie, le terme sorption est souvent employé comme synonyme de celui d'adsorption. Afin de considérer et de distinguer les différents processus physico-chimiques, le terme général de sorption sera employé ici pour désigner tous les processus à la surface (adsorption, absorption, échange ionique, précipitation de surface, coprécipitation). L'adsorption sera considérée comme un de ces processus de sorption.

Spéciation : Distinction entre les différentes formes chimiques possibles (espèces) d'un élément. La spéciation est à la base de la compréhension du devenir des métaux dans les milieux aquatiques (Sigg *et al.*, 2001). C'est la distribution des espèces chimiques d'un élément donné dans un système (Audry, 2003). La spéciation d'un élément dépend de sa concentration et de la chimie de la solution (pH, Eh, complexants, minéraux, etc.). La toxicité d'un polluant vis-à-vis des organismes vivants peut fortement dépendre de sa spéciation.

# **Introduction Générale**

## CONTEXTE ET PROBLEMATIQUE

La contamination de l'atmosphère, des eaux et des sols par les composés organiques et métalliques d'origine naturelle et anthropique engendre des risques sanitaires et environnementaux dont les conséquences commencent à être aujourd'hui bien prises en compte par les décideurs politiques et les législateurs. Plusieurs lois et directives ont déjà fixées des limites de qualités pour les différents milieux que sont l'air, les eaux et les sols vis-à-vis de paramètres chimiques et physico-chimiques connus comme ayant un impact sur la qualité des milieux et sur la santé humaine (Annexe 1 : Arrêté du 11 janvier 2007 relatif aux critères de qualité des eaux brutes et des eaux destinées à la consommation humaine ; Annexe 2 : Arrêté du 8 janvier 1998 fixant les prescriptions techniques applicables aux épandages de boues sur les sols agricoles ; Annexe 3 : Arrêté du 22 juin 2007 relatif à la collecte, au transport et au traitement des eaux usées des agglomérations d'assainissement ainsi qu'à la surveillance de leur fonctionnement et de leur efficacité, et aux dispositifs d'assainissement non collectif).

Dans cette démarche d'appréciation des risques et d'évolution des réglementations, les scientifiques ont un rôle essentiel. C'est à travers les recherches menées de façon pluridisciplinaire que peuvent être mis en relation les niveaux de contamination des milieux et les impacts (éco)toxicologiques des composés, que peuvent être mis en évidence l'existence de certains composés, que peuvent être mis au point les techniques analytiques pour les mesurer et que peuvent être mis au point les méthodes du suivi de ces contaminants (et de leurs métabolites) dans les différents compartiments de la biosphère. Les avancées obtenues dans ces différentes disciplines (chimie, biologie, microbiologie, pédologie, géochimie, ...) permettent d'améliorer continuellement les modèles prédictifs du devenir des contaminants naturels et anthropiques dans biosphère.

Dans les modèles existants de prédiction du devenir des contaminants organiques, les paramètres pris en compte concernent en premier lieu ceux liés aux composés dont on veut prédire le devenir (coefficient de partage eau-octanol, tension de vapeur, par exemple) (Zukowska *et al.*, 2005) ; souvent les modèles ne considèrent le compartiment hôte (sols, sédiments, particules en suspension, eaux) que comme constitué par une matrice inerte sur (ou dans) laquelle les contaminants organiques vont atteindre un équilibre chimique selon leurs

propriétés thermodynamiques (deBruyn et Gobas, 2004 ; Batiha *et al.*, 2009 ; Bergknut *et al.*, 2010). Les paramètres concernant le milieu récepteur se limitent donc souvent à des paramètres globaux comme la DCO (Demande Chimique en oxygène), la DBO (Demande Biologique en Oxygène), le COD (Carbone Organique Dissous), le COT (Carbone Organique Total), le CONP (Carbone Organique Non Purgeable) ou le NTK (Azote Total Kjeldahl).

Dans les modèles de prédiction de la migration des métaux, la gamme des paramètres pris en compte comprend les isothermes de sorption (modèles de Freundlich ou de Langmuir), la capacité d'échange cationique, les coefficients de distribution solide-liquide ( $k_d$ ) (Michel *et al.*, 2007 ; Vidal *et al.*, 2009 ; ), les affinités spécifiques et la spéciation des métaux (Tipping, 2005 ; Jacques *et al.*, 2008).

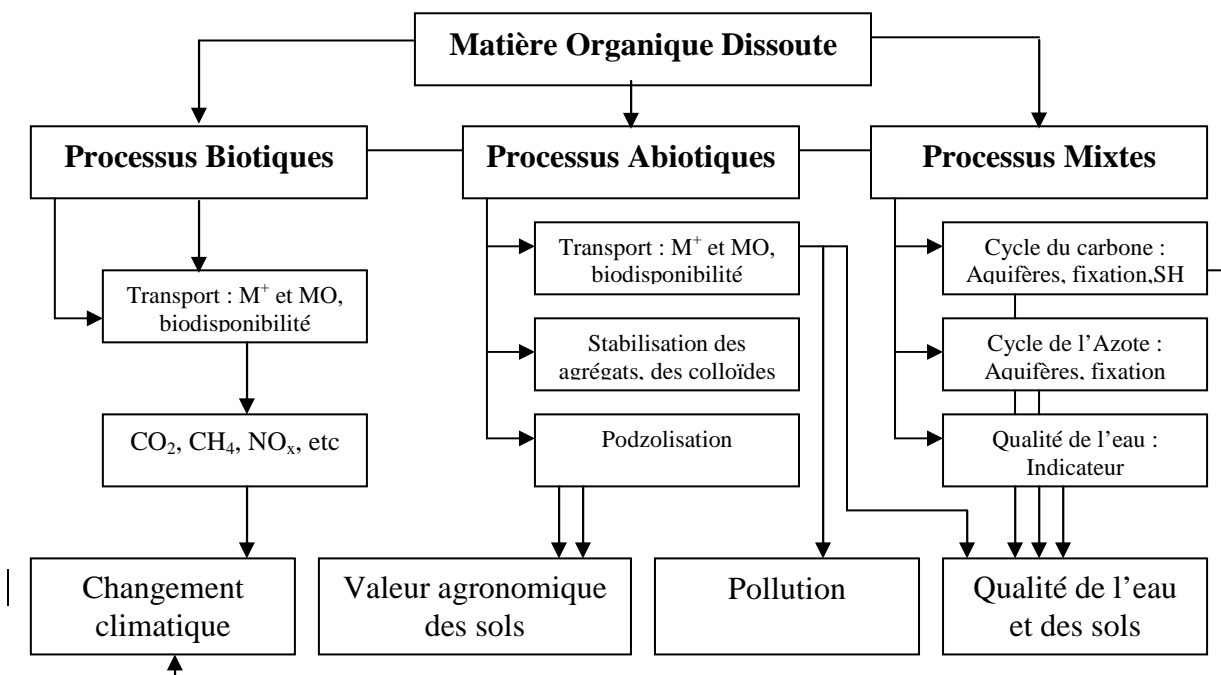
Dans ces modèles, la MOD est donc souvent considérée comme une entité globale, sans prise en compte de l'ensemble de ses propriétés physico-chimiques, et notamment la nature des groupements fonctionnels de surface. Or c'est bien l'ensemble des caractéristiques intrinsèques de la Matière Organique Dissoute (MOD) présente dans ces milieux récepteurs qui va jouer un rôle prépondérant dans le devenir des contaminants organiques et minéraux dans les différents compartiments de la biosphère.

Cette MOD, bien que représentant une faible fraction de l'ensemble des Matières Organiques, est en effet une composante omniprésente dans les différents compartiments naturels de l'environnement : les sols et sédiments (milieux terrestres) (Mac Carty, 2001), les eaux superficielles et souterraines continentales et les eaux de mer (milieux aquatiques) (Artinger *et al.*, 2000). Le terme de MOD est également employé pour décrire l'ensemble des composés organiques que l'on peut trouver dans des écosystèmes totalement artificialisés comme les stations d'épuration (Imai *et al.*, 2002), les usines de potabilisation des eaux potables (Matilainen *et al.*, 2010) ou encore les décharges d'ordures ménagères (Kang *et al.*, 2002).

Cette MOD est composée de familles de molécules organiques qui présentent un nombre important et une diversité de groupements fonctionnels qui leur procurent un caractère très réactif, dépendant de leurs propriétés intrinsèques (solubilité, hydrophobicité, taille, capacité complexante,  $pK_a$ , toxicité).

Suivant l'environnement considéré, les MOD vont avoir un rôle sur les processus à impacts environnementaux : stockage de carbone, émission de gaz à effet de serre (tels que  $CO_2$  ou  $N_2O$ ), transferts d'éléments aux interfaces, puits et source de nutriments, cycles

biogéochimiques, transport de contaminants, etc. en faisant intervenir des processus biotiques, abiotiques ou mixtes (Figure 1).



**Figure 1: Rôles et impacts écologiques de la MOD et (d'après Zsolnay, 1996)**

Chacun de ces environnements se compose de diverses contributions (géologiques, pédologiques, microbiologiques, chimiques), en proportions variables, et est soumis à des conditions physico-chimiques (pH, potentiel d'oxydo-réduction, ...) qui vont induire des réactions de type aéro/anaérobies biologiques, physiques ou chimiques ; l'ensemble de ces réactions vont conduire à des transformations qui vont contrôler l'état, l'évolution et la composition de la MO. En conséquence, la caractérisation et l'identification des groupements fonctionnels et des autres constituants de la MOD constituent un travail délicat, du fait de leur complexité et de leur hétérogénéité. C'est dans cet objectif que de nombreuses techniques analytiques et procédures opératoires ont été développées au cours des années.

A ce jour, la nature de la MOD est limitée à une semi-spéciation permettant de déterminer la teneur en composés hydrophiles et hydrophobes (séparation sur résines macroporeuses par filtration de gel puis par filtration), à estimer un indice d'humification ou, dans le meilleur des cas, en différentes fractions réalisés par extractions séquentielles sur résines ioniques ou non ioniques permettant de définir des teneurs en composés plus ou moins biodisponibles suivant les extractants utilisés. En aval de ces étapes d'extraction, une caractérisation des



groupements fonctionnels est parfois réalisée dans le domaine du proche infrarouge (PIR), par résonance magnétique nucléaire du carbone (RMN- $C^{13}$ ) ou par Pyrolyse couplée à la Chromatographie en phase Gazeuse et détection par Spectrométrie de Masse (Pyr-CG-SM).

Cependant, ces méthodes présentent de nombreux inconvénients tels que :

- les protocoles de séparation et/ou de pré concentration des échantillons varient suivant les auteurs et suivant les types d'échantillons étudiés ;
- les étapes de prétraitement (acidification, extraction chimique, centrifugation,...) dénaturent l'échantillon ; ce qui est mesuré par la suite ne révèle donc pas forcément ce qui était présent dans l'échantillon à l'origine ;
- les méthodes de détection utilisées ne permettent pas une quantification (infrarouge), requièrent des échantillons présentant de fortes teneurs en composés carbonés organiques ( $>5 \text{ mg.L}^{-1}$ ) et une faible teneur en composés minéraux (RMN- $C^{13}$ ) et ne sont donc que rarement applicables à des échantillons de sol, par exemple.
- les procédures analytiques mises en œuvre requièrent des temps d'analyses importants et génèrent des coûts conséquents.

Etant donné l'intérêt environnemental de la MOD et la nécessité d'une méthode alternative de caractérisation rapide, simple et spécifique des principaux composés impliqués dans les divers processus réactionnels, nous avons développé ce projet qui a pour objectif le développement d'une procédure et d'un outil analytique alternatifs, permettant de déterminer qualitativement et quantitativement des groupements fonctionnels de grand intérêt environnemental tel que les acides carboxyliques, les thiols et les amines, présents dans la matière organique.

Dans un premier chapitre, une synthèse bibliographique présentera l'état de l'art des connaissances sur la matière organique dissoute, ainsi que les connaissances des différentes méthodes analytiques couramment employées dans son étude. Un intérêt particulier sera également porté sur les principaux groupements réactionnels présents dans la matière organique, ainsi que sur les méthodes classiques et alternatives d'analyse.

Le second chapitre est consacré au choix des réactifs pour la dérivation et la détection post-dérivation par fluorescence des groupements fonctionnels, ainsi qu'aux techniques d'optimisation et d'automatisation des procédures analytiques.

Le troisième chapitre concerne l'ensemble des résultats obtenus lors de l'optimisation des paramètres influençant la dérivation des amines, thiols et acides carboxyliques, ainsi que le développement d'une méthode alternative automatisée en flux avec détection par fluorescence des acides gras volatils, et la mise au point de l'étape de détection par fluorescence en lecteur microplaque des amines et thiols. L'optimisation des paramètres et la mise au point de l'étape automatisée de détection de chacun des groupements fonctionnels sont validés par une étude sur échantillons réels.

# **CHAPITRE I : Etude Bibliographique**

## I.1. Typologie de la Matière Organique Dissoute

### I.1.1. Typologie selon la composition

La composition de la MOD est difficilement « classable » et très hétérogène du fait de la diversité de ses sources et des différents processus qui l'affectent. On peut néanmoins considérer qu'elle est constituée, de façon générale, d'atomes de carbone, d'hydrogène, d'oxygène, d'azote, de soufre et de phosphore issus essentiellement des êtres vivants (champignons, racines et de l'activité métabolique des microorganismes) appelée biomasse (Baldock et Nelson, 1999). Parmi la MOD naturelle, on peut distinguer :

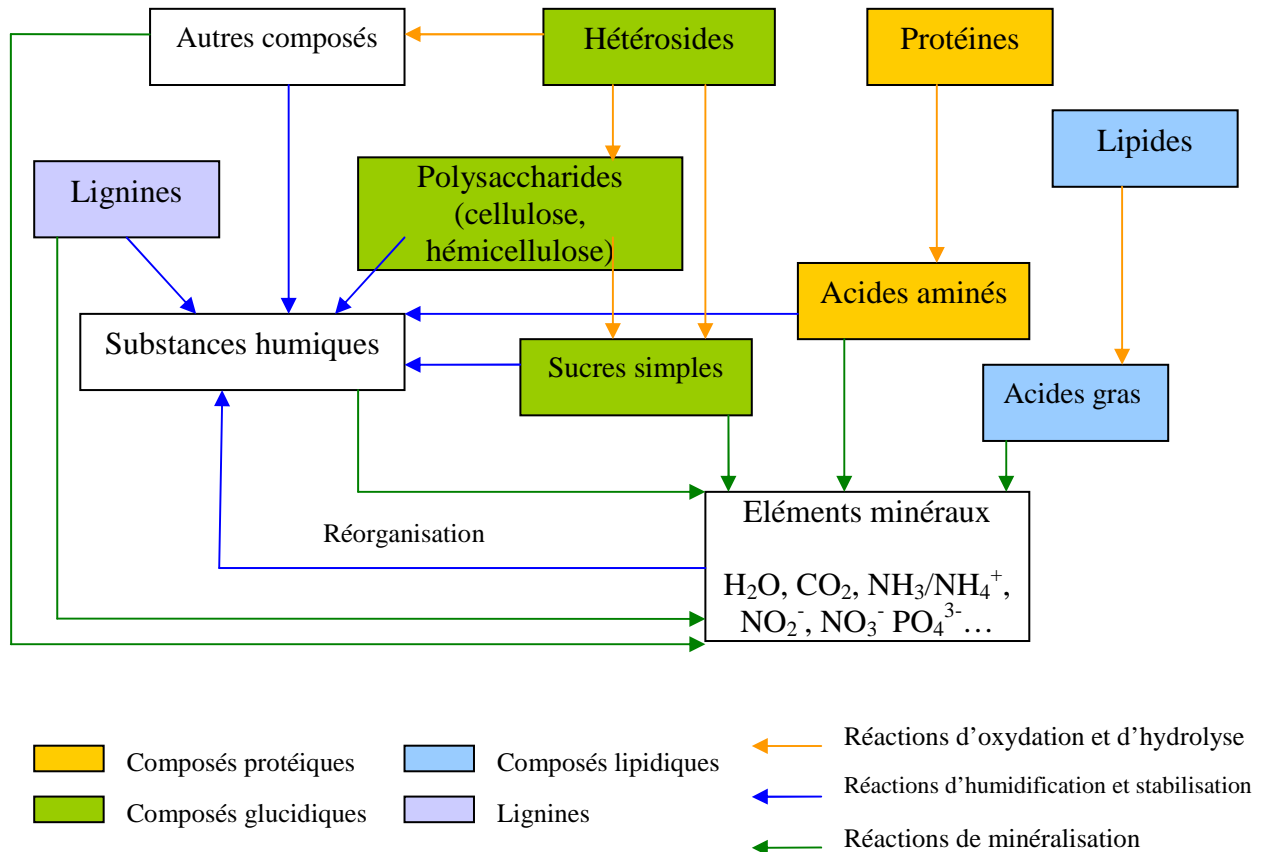
- la « matière organique fraîche » : débris végétaux, cadavres et résidus animaux et microbiens à différents stades de décomposition, ils constituent la matière organique non vivante. Parmi les principaux composés de la MOD fraîche, on différencie les sucres, en particulier la cellulose -qui est le biopolymère le plus abondant-, les acides aminés, les protéines, les lipides et les lignines (Labanowski, 2004 ; Kögel-Knabner, 2002) (Tableau 1).
- les composés réfractaires, issus de la décomposition de cette MOD fraîche, connus sous le nom de substances humiques (SH): acides humiques, acides fulviques, humines, etc. (Dignac, 1998 ; McDonald *et al.*, 2004).

**Tableau 1: Produits de dégradation de la matière organique fraîche (Sigg *et al.*, 2001)**

Substances biologiques	Produits intermédiaires de dégradation	Produits
<b>Protéines</b>	Polypeptides $\Rightarrow$ Acides aminés $\Rightarrow$ RCOOH, $\Rightarrow$ RCH <sub>2</sub> OH, RCH <sub>3</sub> , RCH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , CO <sub>2</sub> , HS <sup>-</sup> , CH <sub>4</sub> , peptides, acides aminés, urée, phénols, indole, acides gras, mercaptans
<b>Lipides</b> Graisses Cires Huiles Hydrocarbures	Acides gras + Glycérine $\Rightarrow$ RCH <sub>2</sub> OH, $\Rightarrow$ RCOOH, RCH <sub>3</sub> , RH	CO <sub>2</sub> , CH <sub>4</sub> , acides aliphatiques, acides : acétique, lactique, citrique, glycolique, maléique, stéarique, oléique, glucides, hydrocarbures

<b>Glucides</b>		
Cellulose	Monosaccharides	Hexoses
Amidon	Polysaccharides $\Rightarrow$	Pentoses $\Rightarrow$
Hémicellulose	Chitine	Glucosamine
Lignine		
Porphyrines et pigments de plants		
Chlorophylle	Phéophytine $\Rightarrow$	Hydrocarbures $\Rightarrow$
Hémine		
Carotène		
Xanthophylle		
<b>Acides nucléiques</b>	Polynucléotides $\Rightarrow$	nucléotides $\Rightarrow$
Substances complexes formées à partir de produits intermédiaires	Phénols, quinones et acides amines $\Rightarrow$	
	Acides aminés et produits de décomposition $\Rightarrow$	
	des glucides	

La transformation de la MOD, naturelle ou anthropique, est réalisée en partie par les organismes vivants et elle varie selon la température, le pH, le taux d'oxygène, la teneur en eau ou encore la teneur en nutriments. En effet, des composés, comme certains sucres ou polypeptides, sont facilement transformés par l'action des microorganismes (Stevenson, 1994). Cette transformation (minéralisation) consiste à dégrader en monomères les polymères tels que les protéines et les sucres, puis en nitrates, nitrites, ammoniac, orthophosphates et dioxyde de carbone. Par contre, d'autres molécules comme la lignine ou les organochlorés, sont à l'inverse plus réfractaires à une transformation naturelle (Kögel-Knabner, 2002 ; Jauzein *et al.*, 1995) et servent de matériaux à l'édification de molécules nouvelles, de plus en plus complexes (processus d'humification) (Figure 2), de nature colloïdale et de couleur foncée, dont l'ensemble constitue les substances humiques.



**Figure 2 : Evolution de la matière organique (d'après Stevenson, 1994)**

### I.1.2. Typologie selon la réactivité

Compte tenu des différentes réactions influençant la formation et l'évolution de la matière organique et suite aux multiples processus de transformation de cette MOD, les éléments constituant la MOD sont très variables. Afin de mieux distinguer ces éléments, plusieurs classements ont été proposés par divers auteurs.

D'après Stevenson (1994), la matière organique est classée en deux pools, l'un actif et l'autre passif.

Le premier contiendrait plutôt des débris végétaux et animaux, la biomasse du sol ainsi que les substances non humifiées, et serait une source d'éléments nécessaires et immédiatement utilisables par les plantes.

Le second pool, quant à lui, est composé principalement de substances humiques qui sont chimiquement récalcitrantes, réfractaires à la biodégradation et avec une très bonne stabilité

physique, et qui constituent ainsi un stock d'éléments nutritifs, avec une utilité à plus long terme.

D'autre part, Senesi *et al.* (1996) ont proposé une classification de la matière organique en trois pools :

- un premier pool « actif » qui contient de la matière organique fraîche ainsi que des biomolécules représentant les produits des processus métaboliques avec des structures chimiques et activités biologiques connues ;
- un deuxième pool appelé « intermédiaire », constitué de composés partiellement dégradés, susceptibles de subir des processus de transformation supplémentaires ;
- un pool « passif », essentiellement composé de substances humiques (SH).

Les proportions en composés identifiables et réfractaires de ces fractions sont dépendantes du milieu étudié et du protocole d'extraction ou d'analyse utilisé. D'autres méthodes de classification de la MOD ont été établies permettant de séparer et classer les composés organiques selon leurs propriétés fonctionnelles et structurales (Leenheer et Croué, 2003). Une telle approche permet d'accéder directement aux propriétés d'importance environnementale des matières organiques

## **I.2. Caractérisation de la Matière Organique Dissoute**

La Matière Organique Dissoute (MOD) constitue une matrice particulièrement délicate à étudier mais surtout à identifier. Pourtant, une caractérisation précise est nécessaire pour essayer de comprendre ses origines, les mécanismes de sa genèse ainsi que pour déterminer ses différents rôles environnementaux au sein d'écosystèmes naturels ou artificiels. Plus précisément, une meilleure connaissance de sa structure et de ses fonctions chimiques contribue à améliorer les connaissances des processus de minéralisation, d'humification ainsi que de la biodisponibilité et de la capacité de mobilisation ou d'immobilisation des polluants organiques et des métaux par cette matrice. C'est pourquoi, la caractérisation de la matière organique repose sur l'analyse élémentaire, structurale et fonctionnelle des éléments qui la composent. Pour cela, plusieurs techniques de caractérisation permettant d'identifier les composés simples et les substances humiques ont été développées et peuvent être regroupées

en trois catégories : caractérisation physico-chimique, caractérisation fonctionnelle et caractérisation structurelle.

### **I.2.1. Caractérisation physico-chimique**

La caractérisation physico-chimique de la MOD peut être réalisée par l'étude i) de la taille des molécules, ii) de la charge des molécules, iii) du caractère hydrophile ou hydrophobe des molécules. Cette caractérisation passe par des étapes d'extraction puis de fractionnement de la MOD.

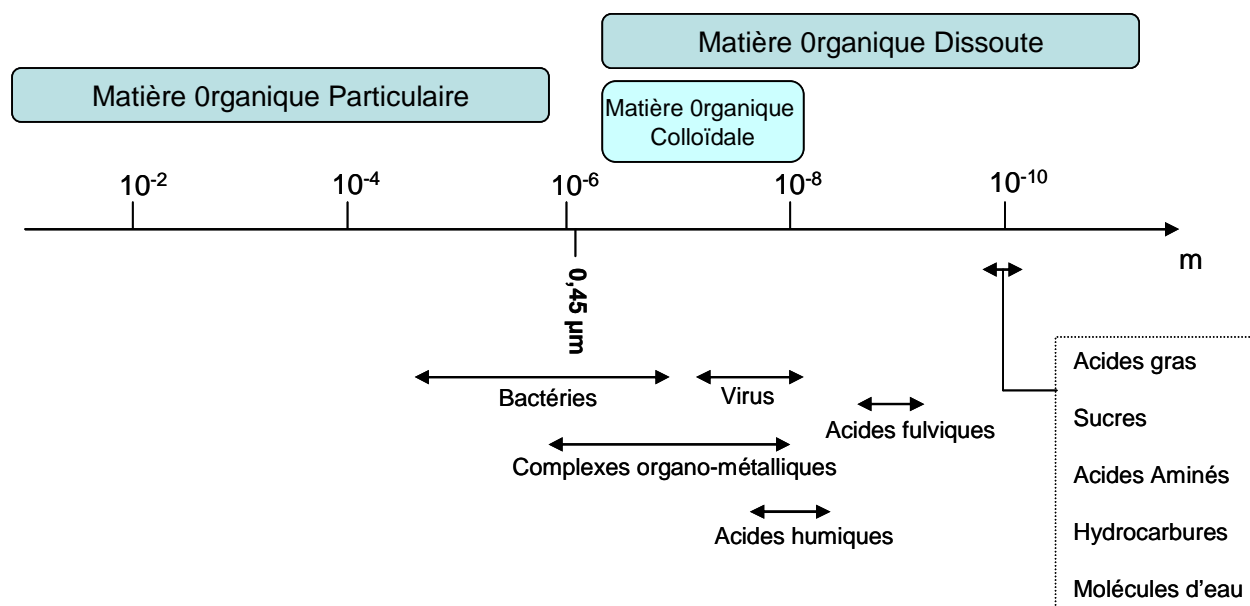
Les extractions des matières organiques conduisent à des solutions contenant des groupes de composés chimiques possédant au moins une propriété en commun, par exemple la taille ou la charge, selon les protocoles chimiques et/ou physiques appliqués. En effet, quel que soit le protocole utilisé, l'extraction conduira logiquement à un fractionnement de la matière organique. Les résultats obtenus vont dépendre de plusieurs facteurs tels que la teneur en métaux du milieu étudié et principalement de la concentration de réactifs utilisés (Calvet, 2003). Les techniques de fractionnement reposent sur différents critères physico-chimiques tels que la taille, la charge, l'hydrophobicité. Le fractionnement constitue donc une première étape de sa caractérisation et ne fournira qu'une description globale de l'intégralité de la MOD.

#### **I.2.1.1. Techniques de séparation par taille**

La Matière Organique Dissoute (MOD), souvent assimilée à la Matière Organique Extractible à l'Eau (WEOM en anglais), correspond à la fraction de molécules organiques traversant un filtre de porosité standard de 0,45  $\mu\text{m}$ .

La fraction retenue sur ce filtre correspond à la Matière Organique Particulaire (MOP) tandis que la Matière Organique Colloïdale (MOC) correspond à la fraction intermédiaire, avec une distinction entre fraction dissoute et fraction colloïdale souvent difficile à établir. Toutefois, de nombreux auteurs situent la taille des colloïdes entre 0,45  $\mu\text{m}$  et 1 nm (Thurman, 1985 ; Sempéré et Cauwet, 1995).





**Figure 3: Fractionnement de la matière organique dans l'environnement (d'après Thurman, 1985 ; Hope *et al.*, 1994)**

Les techniques les plus utilisées dans la séparation selon la taille et le poids moléculaire de la MOD sont la dialyse, l'ultrafiltration, la chromatographie liquide d'exclusion de taille. Ces techniques permettent de déterminer les poids moléculaires moyens et les profils de distribution des masses moléculaires de la MOD. Des techniques telles que la dialyse, l'Ultra Filtration (UF) (Lagier, 2000) sont basées sur l'utilisation de plusieurs membranes possédant des porosités de plus en plus fines permettant d'obtenir une répartition discrète de la taille des molécules (Buffle *et al.*, 1995). Les techniques chromatographiques comme la chromatographie d'exclusion de taille (SEC, Size Exclusion Chromatography) sont basés sur les différences de temps de rétention des composés organiques dans une colonne, ce qui permet d'obtenir une répartition « continue » des molécules dans l'échantillon selon leur taille (exprimée en poids moléculaire rapporté à une molécule modèle) (Hesse et Frimmel, 1999). D'autres techniques emploient des principes différents comme le Fractionnement par couplage Flux-Force (Field-Flow Fractionation, FFF) qui utilise un champ de force (Martin, 1998 ; Gimbert *et al.*, 2003) et la dispersion des rayons X aux petits angles (Small Angle X-Ray Scattering, SAXS) qui se sert des propriétés des rayonnements (Thurman, 1985). Ces méthodes de caractérisation par la taille sont cependant très dépendantes de l'état d'agrégation de la MOD et de ses interactions avec le milieu utilisé pour la séparation (Leenheer et Croué, 2003).

#### I.2.1.2. Techniques de séparation par charge

La séparation des composés selon leur charge est obtenue par une méthode physique, appelée l'électrophorèse, qui est basée sur la migration différentielle des espèces en solution porteuse de charges, sous l'effet d'un champ électrique généré entre deux électrodes. Les composés séparés sont généralement détectés photométriquement (Dunkellog *et al.*, 1997). La séparation des composés par électrophorèse peut être réalisée en utilisant différents types de supports, comme le gel ou le papier, soit dans une solution contenant un seul tampon appelé électrophorèse de zone, soit dans une solution plus complexe contenant un continuum de tampons nommé électrophorèse sur disque.

#### I.2.1.3. Techniques de séparation par hydrophobicité

La séparation selon l'hydrophobicité est basée sur le passage de la MOD sur des polymères adsorbants non ioniques tels que les résines PVP (PolyVinylPyrrolidone), DEAE (cellulose de DiEthylAminoEthyle) et XAD (Thurman et Malcolm, 1981). Parmi toutes les méthodes de fractionnement, seule la technique d'extraction sur résines XAD est reconnue et validée par l'International Humic Substances Society (IHSS) comme protocole standard d'extraction de la matière organique. Les résines XAD sont composées de styrène – divinylbenzène ou polymères de méthacrylate de méthyle avec différents types de groupements greffés. Il existe plusieurs types de résines XAD telles que XAD-1, XAD-2, XAD-4, XAD-7, XAD-8, mais c'est la résine XAD-8 qui est la plus utilisée, grâce à des rendements d'extraction satisfaisants et à une meilleure séparation des fractions.

Un protocole d'extraction a été proposé par Aiken *et al.* (1992) et Malcolm et MacCarthy (1992) : le principe repose sur les propriétés de solubilité (polarité, masse moléculaire) des composés organiques dans l'eau permettant de distinguer les composés dits hydrophobes adsorbés sur la résine XAD-8 à pH acide des composés dits hydrophiles qui ne sont pas adsorbés sur cette même résine.

En 1997, Martin-Mousset *et al.*, ont proposé une modification de la procédure d'extraction en associant en série des résines de type XAD-8 et XAD-4 permettant ainsi la distinction de :

- la fraction hydrophobe est retenue sur la résine XAD-8 ;
- la fraction hydrophile acide, retenue sur résine XAD-4, a une polarité intermédiaire dénommée fraction « transphilique » (Croué *et al.*, 2003).

- la fraction hydrophile basique et neutre n'est pas adsorbée par la résine (filtrat résine XAD-4).

Les composés présents dans chaque fraction sont mentionnés dans le tableau suivant :

**Tableau 2: Substances trouvées dans les fractions spécifiques de la MOD (Qualls et Haines, 1991)**

Fraction	Composés
Neutres hydrophobes	Hydrocarbures, chlorophylle, caroténoïdes, phospholipides, substances humiques
Acides hydrophobes faibles (phénoliques)	Tannins, flavonoïdes, polyphénols, vanille
Acides hydrophobes forts (carboxyliques)	Acide humique et fulvique, acides aminés, peptides et carbohydrates liés à l'acide humique, acides aromatiques, polyphénols oxydés, acides gras (>5 atomes C)
Acides hydrophiles	Substances humiques de faible poids moléculaire avec ratio COOH/C élevé, carbohydrates oxydés avec groupe COOH, petits acides carboxyliques, inositol et autres sucres phosphatés
Neutres hydrophiles	Sucres neutres simples, polysaccharides non liés aux acides humiques, alcools (<4 atomes C)
Bases	Protéines, acides aminés et peptides libres, amines aromatiques, polymères de sucres aminés (parois cellulaires microbiennes)

Malgré la simplicité apparente du protocole, le mécanisme exact du processus de fractionnement sur les résines absorbantes de type XAD n'est toujours pas très bien connu (Peuravuori *et al.*, 1997a). En effet, des interactions hydrophobes, ou des formations de liaisons hydrogènes ou une combinaison de ces interactions peuvent conduire à l'adsorption d'un composé organique sur les résines (Streat et Sweetland, 1997). Dans certains cas, un effet d'exclusion par taille peut avoir lieu, modifiant ainsi les propriétés de rétention de la résine utilisée (Peuravuori *et al.*, 1997b).

### I.2.2. Caractérisation fonctionnelle

La caractérisation fonctionnelle comprend diverses méthodes (généralement non destructrices) qui permettent d'identifier différents types de structures et de fonctions chimiques et non pas des éléments chimiques ou des molécules constituant de la MOD. Cette caractérisation fonctionnelle est principalement basée sur l'utilisation de techniques spectroscopiques particulièrement intéressantes, puisqu'elles peuvent être appliquées soit directement à l'échantillon brut (sol, eaux, substances humiques ou matière organique dissoute), soit à l'issue d'une procédure de fractionnement, en n'utilisant que de faibles concentrations et/ou volumes d'échantillon.

Le tableau 3 décrit les principales informations que l'on peut tirer des différentes techniques utilisées couramment dans la caractérisation fonctionnelle de la MOD.

**Tableau 3: Principales techniques de caractérisation fonctionnelle de la MOD (d'après Abbt-Braun *et al.*, 2004)**

Technique	Information	Phénomène observé
Spectroscopie UV- visible	Caractérisation globale : absorbances, rapports.	Transitions électroniques des électrons de liaison
IR, FTIR, DRIFT	Détermination qualitative (identification des groupes fonctionnels et des structures moléculaires) et quantitative	
Fluorescence	Détermination qualitative et quantitative	
RMN ( $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ , $^{15}\text{N}$ )	Données quantitatives sur les composants structuraux (groupements fonctionnels : aromatiques, aliphatiques, carbohydrates)	Propriétés magnétiques des noyaux atomiques
RMN 2D (H, H, et H, C)	Données qualitatives / quantitatives sur les monomères et les composants (motifs, modèles)	

Raman	Identification des groupes fonctionnels	Vibrations intramoléculaires
-------	---	------------------------------

#### I.2.2.1. Spectroscopie d'absorbance UV/Vis

La spectroscopie d'absorption UV est la technique d'absorption la plus courante pour la caractérisation fonctionnelle de la MOD. L'absorption du rayonnement émis dans le domaine UV comprend une transition électronique d'un ou plusieurs électrons entre l'état fondamental et un état excité. L'absorbance de la MOD peut se produire grâce à la présence des groupements fonctionnels qui absorbent à différentes longueurs d'onde (254, 280, 465 et 665nm) appelés « chromophores ». En effet, les cycles benzéniques et les fonctions alcènes présents dans la MOD qui absorbent dans l'UV, représentent une classe importante de chromophores qui est reliée à l'aromaticité de la MOD (Traina *et al.*, 1990). Cependant, dans la gamme de longueurs d'onde de 200 à 800 nm, certaines espèces minérales telles que les ions nitrates peuvent fortement contribuer à l'absorption de la lumière. Pour cette raison, des absorptivités relatives ou spécifiques (Absorbance en (unité arbitraires)/mg C l<sup>-1</sup>) à 254, 272 et 280 nm sont souvent utilisés, afin de déterminer le degré d'aromaticité de la MOD.

Comme le montre le tableau 4, d'autres propriétés tels que le degré d'humification peuvent être estimés en mesurant le rapport d'absorbance entre celles obtenue à 465 nm et celle obtenue à 665 nm ( $E_4/E_5$ ) (Chen *et al.*, 1994 ; Stevenson, 1994). En effet, un faible rapport d'absorbance, est synonyme d'un important degré d'humification ou « maturation » et condensation des composés étudiés.

**Tableau 4 : Principales longueurs d'onde et rapports utilisés dans la caractérisation de la matière organique**

Longueur d'onde	Propriétés	Références bibliographiques
254 nm	L'intensité d'absorption augmente avec l'aromaticité	Chen <i>et al.</i> , 1994
272 nm, 280 nm	L'intensité d'absorption augmente avec l'aromaticité et la masse moléculaire	Traina <i>et al.</i> , 1990 ; Chen <i>et al.</i> , 1994
250 nm / 365 nm ( $E_2/E_3$ )	La valeur diminue avec	Peuravuori <i>et al.</i> , 1997 ;

	l'aromaticité et la masse moléculaire	Hautala <i>et al.</i> , 2000
465 nm / 665 nm (E <sub>4</sub> /E <sub>6</sub> )	La valeur diminue avec la condensation des molécules et le degré d'humification	Piccolo <i>et al.</i> , 1992 ; Stevenson, 1994

#### I.2.2.2. Spectroscopie Infrarouge

Cette technique, utilisée communément dans l'étude de la MOD d'origine terrestre (Stevenson, 1994), est basée sur l'absorption de rayonnements dans la région infrarouge (IR) laquelle met en évidence la nature des liaisons (C-C, C-O, C-H, C-N, O-H, etc.) et donc la présence des groupements fonctionnels suite à la vibration et à la rotation de ces liaisons consécutives à l'absorption d'énergie. Les bandes d'absorption spécifiques des structures organiques en spectroscopie IR les plus courantes sont présentées dans le tableau 5.

**Tableau 5: Bandes d'absorption spécifiques des structures organiques en spectroscopie IR présentes dans les extraits de MOD (Croué *et al.*, 2000 ; Dignac *et al.*, 2001 ; Field *et al.*, 1992 ; Leenheer et Rostad, 2004)**

Groupements fonctionnels	Nombres d'ondes (cm <sup>-1</sup> )
O-H	3400-3300
N-H	3200
C-H	2960 et 1380 (CH <sub>3</sub> ), 2940 et 1460 (CH <sub>2</sub> )
COOH	2700-2500, 1730-1720, 1220-1180
COOR	1760
C=O	aromatique 1660-1630
C-O	1100-1000 (sucres), 1150-1280 (phénols, acides)
N-C=O	1660 (amide 1), 1550 (amide 2)
SOOH	1040

L'analyse par infrarouge met à profit une plage des radiations électromagnétiques qui correspond au proche, au moyen et au lointain infrarouge.

L'infrarouge lointain, allant approximativement de 400 à 10 cm<sup>-1</sup> (1000–30 µm), adjacent à la région micro-onde, a une énergie faible et peut être utilisé pour la spectroscopie rotationnelle.

L'infrarouge moyen, allant approximativement de  $4000$  à  $400\text{ cm}^{-1}$  ( $30\text{-}1,4\text{ }\mu\text{m}$ ), peut être utilisé pour étudier les vibrations fondamentales et la structure rotationnelle et vibrationnelle associée.

Le proche infrarouge, plus énergétique, allant approximativement de  $14000$  à  $4\,000\text{ cm}^{-1}$  ( $1,4\text{-}0,8\text{ }\mu\text{m}$ ) peut exciter les vibrations harmoniques. Le domaine du moyen infrarouge est plus utilisé et plus riche en informations sur les structures des composés analysés que le proche infrarouge, qui présente peu d'absorptions spécifiques.

La Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier est la technique de spectroscopie IR la plus répandue pour la caractérisation de la matière organique (Davis *et al.*, 1999 ; Tanaka *et al.*, 2001). Elle possède notamment une plus grande sensibilité grâce à un rapport signal sur bruit plus élevé. Cependant, elle est soumise à des interférences dues à la présence des composés minéraux, ce qui rend difficile l'exploitation quantitative des spectres (Janik *et al.*, 1995).

Afin d'éviter ce problème, d'autres techniques IR ont été développées, particulièrement la spectroscopie de réflectance diffuse d'infrarouge à transformer de Fourier (RD-IRTF) qui est considérée comme la technique la plus sensible parmi les techniques de spectroscopie infrarouge.

#### I.2.2.3. Spectroscopie de fluorescence

La technique de spectroscopie par fluorescence a l'avantage d'offrir une meilleure résolution des spectres (Hautala *et al.*, 1999), permettant ainsi de fournir d'importantes informations sur les structures, les groupements fonctionnels et les interactions inter- et intramoléculaires des composés organiques (Mobed *et al.*, 1996). Elle offre également une bonne sensibilité et n'utilise que de petits volumes et permet de doser des faibles concentrations.

Les molécules fluorescentes ne constituent qu'une partie de la MOD (Miano et Senesi, 1992) ; elles se caractérisent principalement par des composés avec des cycles aromatiques condensés, mais également par des groupes carbonyles, hydroxyles, thiols et amines (Miano et Senesi, 1992 ; Senesi, 1990). En effet, pour produire de la fluorescence, les molécules doivent absorber dans le domaine UV-Visible, ce qui n'est possible que lorsqu'on a présence de systèmes d'électron  $\pi$  conjugués (comme dans les molécules polyinsaturées et aromatiques).

L'acquisition des spectres de fluorescence peut être obtenue de différents façons : soit en mode excitation, soit en mode émission, soit en mode émission/excitation synchrone (Fluorescence EES).

En mode excitation, Zsolnay *et al.* (1996) ont développé un nouvel indice d'humification, fondé sur le ratio entre l'aire sous pics comprise entre 450 et 500nm et l'aire sous pics comprise entre 360 et 400 nm, après excitation à 254 nm. Cet indice d'humification ne permet pas de caractériser précisément la matière organique mais donne une indication sur la proportion de molécules organiques de faible poids moléculaire par rapport à celle en molécules organiques de haut poids moléculaire.

La spectroscopie de fluorescence synchrone enregistre le spectre d'émission en gardant entre les longueurs d'ondes d'émission et d'excitation un écart constant permettant d'obtenir une bonne résolution des pics des différents types de composés organiques (Senesi, 1990). La combinaison des modes excitation/émission donne comme résultat une matrice ou un spectre tridimensionnel. Cette technique de fluorescence à 3 dimensions est aujourd'hui la plus utilisée (Hudson *et al.*, 2007). Par cette technique, il est possible de visualiser le domaine spectral dans son ensemble et de suivre l'évolution de la matière organique par l'étude de l'évolution du nombre de pics de fluorescence et des intensités maximales des fluorophores qui composent l'échantillon. Comme le montre le tableau 6, un certain nombre de pics peuvent apparaître sur les spectres 3D, à des intensités et à des positions diverses en fonction de la nature et d'origine des composés. Ainsi, des différences entre des acides fulviques de différentes origines ont été détectées (Senesi, 1990). Il a également été montré que la forte intensité de fluorescence des composés de types protéiques peut être utilisée comme marqueur de la MOD d'origine anthropique (rejets de stations d'épuration et effluents urbains) (Baker *et al.*, 2003 ; Baker et Spencer, 2004 ; Galapate *et al.*, 1998 ; Reynolds, 2003 ; Reynolds et Ahmad, 1997). Afin d'illustrer les informations que l'on peut obtenir à partir de spectres 3D de fluorescence, l'annexe 4 présente les 5 domaines à considérer lorsque l'expérimentateur souhaite discriminer la Matière Organique Dissoute (Chen *et al.*, 2003).



**Tableau 6: Types de fluorophores identifiés par spectroscopie de fluorescence en fonction de leur position sur un spectre tridimensionnel (Coble, 1996 ; Hudson *et al.*, 2007 ; Parlanti *et al.*, 2000)**

Nomenclature		$\lambda_{\text{ex}}$ (nm) excitation	$\lambda_{\text{em}}$ (nm) émission	Type de fluorophores
(Coble, 1996)	(Parlanti <i>et al.</i> , 2000)			
A	$\alpha'$	230 - 260	380 - 480	Substances humiques
C	A	330 - 370	420 - 480	Substances humiques
M	B	310 - 320	380 - 420	Substances humiques marines
B	$\Gamma$	225 - 250	300 - 320	Protéine type tyrosine
T	$\Delta$	225 - 275	320 - 380	Protéine type tryptophane

#### I.2.2.4. Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire

La spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN), particulièrement du  $^{13}\text{C}$ , est une technique spectroscopique très utilisée dans la caractérisation de la MOD (Tableau 7). Bien que les RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  et  $^{13}\text{C}$  ont été utilisées pour analyser les matières organiques de différents sources, seules les RMN  $^{13}\text{C}$  et  $^{15}\text{N}$  ont été intensivement utilisées (Hatcher *et al.*, 2001) spécialement pour les MOD d'origine terrestre (Stevenson, 1994 ; Kögel-Knabner, 1997 ; Piccolo *et al.*, 1996).

Le principe de cette technique consiste à faire passer le noyau d'un atome d'un niveau d'énergie à un autre par absorption d'un photon, et lorsque l'énergie du photon et donc la fréquence de l'onde électromagnétique permettent cette transition, il y a résonance. Cette transition est provoquée par un champ magnétique intense et constant. Cette technique à l'avantage d'être non destructive et de présenter la possibilité d'analyser les composés organiques dans leurs matrices naturelles, évitant ainsi des réactions secondaires occasionnées par des procédures d'extraction (Peuravuori *et al.*, 2003).

L'analyse d'échantillons avec la technique RMN  $^{13}\text{C}$  offre des informations sur la structure centrale des composés organiques plutôt que la périphérie comme la RMN  $^1\text{H}$ . Dans le cas de

la RMN  $^{15}\text{N}$ , elle a été employée dans le but d'analyser les groupements fonctionnels azotés et le cycle de l'azote dans des échantillons (Kögel-Knabner, 1997).

**Tableau 7 : Déplacements chimiques des composés pouvant être observés par RMN  $^{13}\text{C}$**

Déplacement chimique (ppm)	Types de composés	Groupements chimiques
0 – 55	Carbone aliphatique	C-H
40 – 55	Amine, amide, protéine	C-N
55 – 60	Groupe méthoxy lignine et tannin	O-CH <sub>3</sub>
60 – 90	Alcool aliphatique, éther ester	C-O
90 – 100	Carbone anomérique sucre	O-C-O
95 – 165	Carbone aromatique	$\Phi$
135 -165	Ester aromatique, éther, amide	$\phi$ -O
160 – 190	Acide carboxylique, ester, amide	O=C-O ; O=C-N
170 – 200	Flavone, quinone	O=C-C=C
190 – 220	Cétone aliphatique et aromatique	O=C-C

Bien que cette méthode reste l'une des plus appréciées pour l'analyse de la matière organique, certains inconvénients sont à prendre en considération. En effet, la faible abondance des isotopes du carbone et de l'azote rend nécessaire une étape de préconcentration de l'échantillon. De plus, les temps d'acquisition et d'analyses des spectres sont excessivement longs (Gonzalez-Vila *et al.*, 2001 ; Poirier *et al.*, 2000) et l'interprétation des résultats est difficile.

### I.2.3. Caractérisation structurale

Les techniques de caractérisation structurale, comme la pyrolyse couplée à la chromatographie en phase gazeuse et à la spectrométrie de masse (pyrolyse-CG-SM) (Dignac, 1998 ; Hatcher *et al.*, 2001 ; Labanowski, 2004), et la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (CPL/SM, CPL/SM/SM) (Reemtsma, 2001) permettent d'étudier la composition structurale de la MOD pour des composés à haut poids moléculaire (Dignac, 1998). Ces méthodes se caractérisent par leur précision et leur sensibilité, mais aussi par la difficulté de mise en œuvre et leur coût d'analyse élevé.

La pyrolyse est une méthode de dégradation thermique non sélective, qui fournit de manière indirecte des informations sur les principales unités structurales des macromolécules, lesquelles seront ensuite isolées et analysées. Cette technique reste pour l'instant la plus utilisée dans l'étude structurale de la matière organique (McDonald *et al.*, 2004). Elle a été employée dans la caractérisation et le suivi du degré d'humification de sols (Almendros *et al.*, 1996), dans l'étude de la matière organique fossile (Zegouagh *et al.*, 1999) et dans le suivi de l'évolution de la matière organique en cours de compostage (Dignac *et al.*, 2000). Cependant, l'ensemble des analyses moléculaires ne permet pas de caractériser la MOD dans sa totalité. Ainsi, une grande proportion de la MOD reste donc « irrésolue » par ce type d'analyse et cette proportion varie selon l'origine de la MOD, son âge et donc son degré de biodégradation et de transformation (Hedges *et al.*, 2000).

#### **I.2.4. Caractérisation élémentaire**

La caractérisation élémentaire de la matière organique a pour objectif de déterminer la composition élémentaire en carbone (C), hydrogène (H), oxygène (O), azote (N), et soufre (S) des composés organiques. La quantification de ces composés offre des informations sur la polarité et saturation des chaînes carbonées des constituants de la MOD. En effet, la saturation des chaînes carbonées qui présentent un caractère aromatique ou un degré de condensation, peut être estimée par les rapports O/C et H/C (Stevenson, 1982) et la polarité calculée par le rapport (N+O)/C ou encore H/O.

### **I.3. Groupements d'intérêt environnemental**

Parmi l'ensemble des groupements fonctionnels qui caractérisent la MOD, notre travail de recherche s'est plus particulièrement focalisé sur 3 fonctions présentant des réactivités élevées dans les écosystèmes, et dont le développement de méthodes analytiques alternatives spécifiques peut revêtir un intérêt pour la recherche mais également pour des applications industrielles.

#### **I.3.1. Amines primaires et acides aminés**

Les groupements aminés comprennent plusieurs classes de composés tels que les amines aliphatiques, les hexosamines et les acides aminés, formés naturellement par l'activité

métabolique des microorganismes, des plantes et des animaux, dont les principales voies de formation comprennent, pour la formation des amines : la décarboxylation des acides aminés, l'amination des composés carbonylés et la dégradation des composés azotés (Billiet, 1992) ; la formation des acides aminés résulte principalement de l'hydrolyses de protéines.

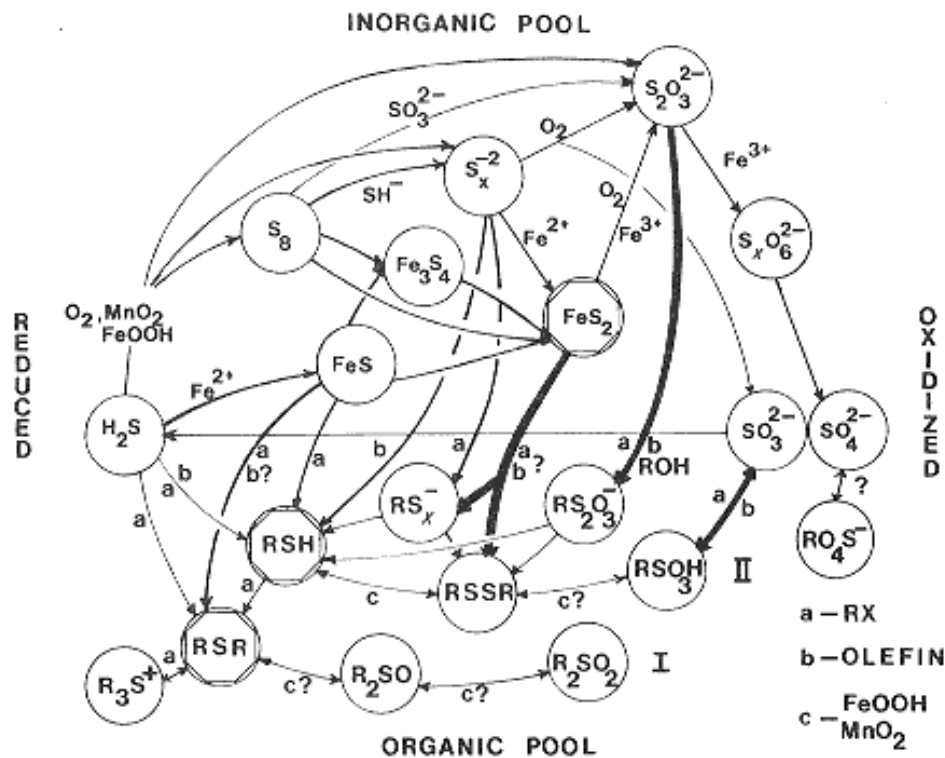
La présence des composés aminés dans l'environnement (atmosphère, sol et eau) provenant des sources anthropiques sont principalement attribuées à l'incinération des déchets (Seeber *et al.*, 1998), la fabrication de divers produits chimiques industriels (par exemple, les pesticides, les médicaments, les colorants, les polymères, les agents de surface, les inhibiteurs de corrosion et les produits cosmétiques), le traitement des eaux usées (Seeber *et al.*, 1998, Skarping *et al.*, 1994) et celui des eaux potables. Dans ces domaines du traitement des eaux, il a été montré que les acides aminés totaux sont présents à de faibles concentrations, de l'ordre de 1 à 3 % du carbone organique dissous, mais constitueraient néanmoins une fraction importante de la demande en chlore des eaux traitées (Jadas-Hécart, 1989 ; Hureiki *et al.*, 1994). De plus, des travaux réalisés par Hureiki *et al.* (1994) ont montré que certains acides aminés retrouvés dans les eaux de surface sont fortement précurseurs de composés organohalogénés.

Les amines « naturelles » résultent de processus métaboliques de la dégradation, de l'hydrolyse et de l'excrétion, à différents niveaux de la chaîne alimentaire. Par exemple, la matière organique du sol contient généralement environ 30% de son azote sous la forme d'acides aminés (Stevenson, 1982). Par conséquent, il est probable qu'une proportion importante de  $\text{NH}_4^+$  libéré de la matière organique soit issue de l'hydrolyse microbienne, désamination interne et excrétion de  $\text{NH}_4^+$  contenu dans les acides aminés (Barraclough, 1997). Il est donc nécessaire d'effectuer une analyse détaillée des apports de composés aminés dans le sol, afin de connaître leur influence dans l'activité microbienne, le taux de lessivage et le degré de sorption et donc de comprendre leur rôle dans le cycle de l'azote.

L'analyse de composés aminés peut donc s'appliquer à une grande diversité de processus environnementaux que ce soit dans les écosystèmes terrestres, les écosystèmes aquatiques continentaux et marins (Antia *et al.*, 1991; Jones et Darrah, 1994; Kielland, 1995; Hodge *et al.*, 2000a, b; Owen et Jones, 2001), ainsi que à divers processus industriels.

### I.3.2. Thiols

Les thiols ont un pKa compris entre 9 et 11 et peuvent être facilement oxydés (par création de ponts disulfures, par exemple) et reconvertis en thiols selon différentes voies enzymatiques (Meister and Anderson, 1983). Ces caractéristiques font des thiols des éléments structuraux des protéines, agissant comme des systèmes de défense contre l'oxydation (antioxydants) (Gilbert, 1984), et des intermédiaires dans la formation de plusieurs composés sulfurés (Flock, 1997) (Figure 4).



**Figure 4 : Schéma du cycle du soufre (d'après Luther III, 1986)**

Les composés organiques comportant un groupement sulfhydryl ou thiols (R-SH), en particulier les composés hydrophiles de faible poids moléculaire (tels que la glutathione, la cystéine, l'acide thioglycolique, l'acide mercaptoéthanesulfonique et l'acide 3-mercaptopropionique), jouent un rôle très important dans différents processus biochimiques et environnementaux. En effet, ils permettent l'incorporation du soufre dans la matière organique : lorsqu'un thiol réagit avec les liaisons insaturées d'une molécule organique, des sulfures organiques se forment. Si cette réaction se fait intra-moléculairement, les produits formés sont des sulfures cycliques ; si elle se produit par une réaction inter-moléculaire, elle donnera lieu à un sulfure à structure linéaire. L'interaction intermoléculaire entre deux thiols

simples permet de former un pont disulfure, mais lorsqu'une molécule contient plusieurs sites thiols, un réseau de ponts de disulfure va se former, constituant ainsi des macromolécules complexes de poids moléculaire élevé, tels que les substances humiques (Vairavamurthy *et al.*, 1997).

Les thiols jouent un rôle prépondérant dans les phénomènes de dissolution et de transport des éléments minéraux à l'état de trace dans les sols. Ainsi l'analyse des thiols peut être appliquée à une grande diversité de processus environnementaux, particulièrement dans le domaine de la bioremédiation puisque, grâce à la forte réactivité du groupement sulfhydryl, les thiols peuvent complexer des métaux de transition (Boulegue *et al.*, 1982), agissant ainsi comme des agents de dépollution de métaux.

### **I.3.3. Acides carboxyliques**

La présence des acides carboxyliques aliphatiques dans l'environnement résulte d'une multitude de sources biologiques, de processus géologiques, de réactions (bio)géochimiques et des émissions anthropiques. De nombreux organismes, y compris les bactéries, les champignons et les algues, ainsi que les plantes supérieures et les animaux, excrètent des acides organiques dans leur habitat. En outre, la dégradation et l'humification de la biomasse morte libère des quantités importantes d'acides organiques. Les principales sources d'émissions anthropiques sont les résidus et sous-produits de l'agriculture et la transformation des aliments, les déchets organiques et les divers produits issus de leur traitement et de leur élimination (par exemple boues d'épuration et lixiviats de décharge).

Une meilleure compréhension de la distribution des acides carboxyliques aliphatiques permettra de connaître leur contribution au carbone organique total dans les différents compartiments des écosystèmes, leur intégration dans les cycles biogéochimiques du carbone, leurs fonctions écologiques et de leurs interactions éventuelles avec des ions métalliques et des minéraux, ainsi que les différents processus de transfert des composés métalliques entre les différents compartiments de l'environnement.

Techniquement, l'analyse des acides carboxyliques, en particulier des acides gras volatils (AGV) est de grande importance, principalement dans les procédés de traitement anaérobie (dans les usines de traitement des boues d'épuration, dans les industries alimentaires, la

production industrielle d'éthanol ...), puisque des concentrations élevées des AGV causent une baisse de pH, et donc, un stress microbien, lequel cause une réduction de l'efficacité et une chute de la stabilité des procédés de traitement anaérobie. Par conséquent, la concentration en AGV devrait être surveillée en permanence dans les fermenteurs.

L'analyse des acides organiques revêt donc un intérêt primordial dans des domaines à la fois environnementaux mais également industriels.

#### **I.3.4. Méthodes classiques de détection**

Diverses méthodes de détection sont utilisées pour l'analyse des acides carboxyliques aliphatiques, des composés thiols et des amines. Ces méthodes sont basées principalement sur des techniques classiques de titration acido-basique, des techniques chromatographiques et des mesures ampérométriques.

##### **I.3.4.1. Titration acido-basique**

La titration est une technique utilisée principalement pour la détection des acides carboxyliques. En effet, des techniques simples -comme le dosage par l'acétate de calcium (Masini *et al.*, 1998; Stevenson, 1994)- permettent de mesurer la part de groupements acides de type carboxylique dans une matrice organique solubilisée.

La technique de titration acido-basique a été très utilisée dans les contrôles de routine des réacteurs anaérobiques où le suivi de la concentration des AGV est impératif afin d'assurer un bon fonctionnement du réacteur. Dans ce contexte, certains chercheurs ont proposé un système adapté pour l'analyse des AGV sur site en fonction de la méthode de titration. La première méthode de titrage « en 5 points » a été développée par Moosbrugger *et al.* (1993) ; une amélioration de cette méthode a été proposée par Lahav *et al.* (2002) en utilisant huit points d'observations de pH. Malgré l'utilité de cette méthode dans l'analyse sur site des AGV, ces méthodes de titrage souffrent d'inconvénients liés aux interférences dues à la présence d'ions métalliques qui peuvent former des complexes avec des groupes carboxyliques (Lahav *et al.*, 2005) ou encore, liés à des protocoles jugés trop complexes ou trop approximatifs pour une application pratique générale.

#### I.3.4.2. Techniques chromatographiques

Diverses techniques d'analyse par séparation ont été développées pour la détection des différents groupements fonctionnels étudiés. Les techniques chromatographiques telles que la Chromatographie en phase Gazeuse (CG) et la Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC) nécessitent des étapes préalables d'hydrolyse et/ou l'ajout d'un réactif de dérivation à l'échantillon et permettent la détection d'une seule famille de composés à la fois.

La Chromatographie Liquide Haute Performance s'est imposée au cours du temps, et plus particulièrement la chromatographie d'échange d'ions ou "chromatographie ionique" qui de nos jours est utilisée pour la séparation et la détection d'ions inorganiques (exemple:  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , ...), de quelques acides organiques (citrate, acétate, ... ) et de composés aminés (méthylamine, diméthylamine, triméthylamine, ... ) (Meyer, 1992).

En chromatographie ionique, le mécanisme de séparation se produit par échange d'ions entre une phase stationnaire, qui portent des groupements fonctionnels chargés, et la phase mobile. Dans la solution, les ions séparés quittent la phase stationnaire (colonne de séparation) par groupe d'ions semblables, les uns après les autres, et sont ensuite identifiés par un détecteur du fait de propriétés physico-chimiques qu'ils possèdent.

Divers détecteurs peuvent être couplés aux techniques chromatographiques, ces détecteurs peuvent être classés en deux groupes de détection : méthodes électrochimiques et méthodes optiques.

Dans les méthodes de détection électrochimique, la mesure de la conductivité est la plus utilisée pour détecter les ions organiques et inorganiques de petite taille ; leur grande mobilité leur confère une conductivité élevée, ce qui permet ainsi de détecter des petits acides carboxyliques.

Une autre technique électrochimique utilisée est l'ampérométrie avec courant continu, utilisée pour détecter la plupart des molécules facilement oxydées ou réduites ou la détection par ampérométrie avec courant alternatif dans laquelle le courant est mesuré seulement dans des zones déterminées de la ligne ondulée du potentiel d'oxydoréduction. Cette méthode est appropriée pour les analytes dont les produits d'oxydation se déposent à la surface des



électrodes de mesure. Il s'agit notamment d'hydrates de carbone (sous forme ionique à des valeurs élevées de pH) ainsi que la plupart des composés sulfurés comme les thiols (Johnson *et al.*, 1993).

Le principe de la méthode de détection par photométrie se résume en une mesure directe de l'absorption des analytes dans les zones du visible ou des ultraviolets du spectre électromagnétique. Cette méthode concerne pour la plupart des acides et amines aromatiques ou hétérocycliques comme l'acide benzoïque, l'acide sulfo-benzoïque, l'aniline, la pyridine et leurs dérivés substitués ortho, méta ou para (Rey *et al.*, 1996). Cependant, pour des composés qui ne sont pas aromatiques, la détection par photométrie offre généralement une résolution insuffisante, car la séparation et la détection, sans une méthode de dérivation préalable, ne sont ni sélectives ni sensibles.

De ce fait, des réactifs de dérivation pré- ou post-colonne comme par exemple l'o-phthaldialdéhyde (OPA) en présence d'un thiol (Saito *et al.*, 1994 ; Campins-Falco *et al.*, 2001), le chloroformiate de 9-fluorénylméthyle (FMOC), la 1,2-naphthoquinone-4-sulfonate (NQS) (Farell *et al.*, 1983), le chlorure de 3,5-dinitrobenzoyl (DNB-Cl) (Herraez-Hernandez *et al.*, 1997), le chlorure de dansyle (DNS) (Cobo et Silva, 1999) peuvent être utilisés pour la qualification et quantification des amines, des thiols et des acides carboxyliques.

Des techniques, comme la chromatographie en phase gazeuse, permettent de détecter des composés (par exemple des acides gras volatils) sans ajout de réactif de dérivation. Toutefois, cette technique est difficile à implémenter, est coûteuse et ne permet pas l'analyse sur site des AGV.

### **I.3.5. Méthodes alternatives**

Les méthodes analytiques alternatives s'opposent aux techniques dites de référence, standards ou encore normalisées, et plus généralement aux techniques de laboratoire faisant appel à du matériel analytique difficilement transportable sur le terrain. La norme AFNOR XP T 90-210 de janvier 1996 établit une méthode alternative comme « une méthode permettant d'analyser ou d'estimer, pour un type d'échantillon donné, le même paramètre que celui mesuré par la méthode de référence, mais qui présente des différences substantielles par rapport au protocole de la méthode de référence » (Norme AFNOR, XP T 90-210, 1996)

Le développement des différentes méthodes alternatives pour le dosage et la détermination de paramètres physico-chimiques dans différentes matrices peut s'expliquer par le fait que la durée d'analyse et le temps d'obtention des résultats par les méthodes de laboratoire sont généralement assez longs; de plus, aux temps d'analyse et d'interprétation des résultats, il faut ajouter les temps de prélèvements, de stockage, de transport et de prétraitement des échantillons. Ces durées assez longues sont donc incompatibles avec le suivi des composés (exemple : acides gras volatils) en temps réel et les mesures sur site. Enfin, le protocole analytique employé pour une analyse au laboratoire (prélèvement, stockage, transport, prétraitement) induit des biais analytiques.

Contrairement aux analyses d'échantillons en laboratoire, les mesures réalisées avec les méthodes alternatives permettent de prendre en compte la variabilité du milieu, ainsi que d'analyse en temps réel afin de réagir rapidement. De plus, ces méthodes permettent d'augmenter le nombre de fréquences d'analyses. Ces caractéristiques incitent fortement à développer des outils analytiques qui soient automatisés afin de réduire les coûts d'analyse. Parmi les méthodes alternatives automatisées utilisées pour l'analyse des groupements fonctionnels étudiés, nous pouvons citer l'analyse en flux et l'analyse en microplaque.

Les méthodes en flux sont utilisées dans les automates de mesures ou analyseurs automatiques. L'automate reproduit toute la chaîne analytique, depuis le prélèvement de l'échantillon jusqu'à la quantification du paramètre. Les automates permettent de reproduire pratiquement toutes les étapes de prétraitement d'échantillon, de formation de mélanges réactionnels et de détection. Ces méthodes en flux sont facilement adaptables à tout type de détecteurs, qu'ils soient optiques, électrochimiques ou autres. Pour la détection, l'analyse spectrale (dans le domaine de l'Ultra-violet, du Visible, ou par fluorescence) est une des méthodes les plus appropriées aux mesures sur site. Elle est peu coûteuse, peu encombrante et facilement automatisable.

La méthode en microplaque est composée de multiples «puits» qui peuvent être utilisés pour un des trois objectifs: production, stockage ou analyse de réactifs et/ou échantillons. La microplaque est devenue un outil standard dans la recherche analytique et clinique particulièrement dans le dosage immuno-enzymatique (test ELISA), puisqu'elle permet une

analyse multi-échantillon, ainsi que le travail avec des volumes très faibles des réactifs et des échantillons.

L'objet de ce travail de recherche étant de concevoir un système d'analyse en microplaque et/ou en ligne, ces deux techniques seront plus détaillées dans la partie suivante de ce mémoire.

# **CHAPITRE II : Développement Méthodologique**

## **II.1. La spectrofluorimétrie UV – visible : Principe**

La photoluminescence (fluorescence et phosphorescence) est une caractéristique que possèdent certains composés à émettre de la lumière lorsqu'ils sont soumis à une excitation par des photons. Ce phénomène a permis l'émergence de plusieurs techniques d'analyse sélectives et très sensibles. Parmi les techniques basées sur ces phénomènes photoluminescents figurent la spectrofluorimétrie qui permet de mesurer la fluorescence en solution de molécules et d'ions, et la phosphorescence, plus rarement employée du fait de la complexité de l'instrumentation.

La phosphorescence et la fluorescence sont deux phénomènes distincts. La phosphorescence représente une photoluminescence retardée, correspondant à l'émission lumineuse d'un objet plongé dans l'obscurité après avoir été exposé quelques temps auparavant à de la lumière ; l'émission lumineuse a donc une durée de vie beaucoup plus grande après la phase d'excitation. Par opposition, la fluorescence décroît de manière exponentielle dès que l'excitation cesse.

Les phénomènes photoluminescents, d'un point de vue fondamental, résultent de l'absorption de la lumière UV/VIS par des molécules ou espèces ioniques, générant des états électroniques excités entre les différentes orbitales moléculaires après un apport d'énergie sous forme de photons. Le diagramme de Jablonski (Figure 5) (Jablonski, 1933) représente l'absorption et l'émission de la radiation lumineuse entre les niveaux d'énergie d'une molécule photoluminescente typique. D'après la distribution de Boltzman, à température ambiante, les électrons se trouvent au niveau vibrationnel le plus bas, celui de l'état électronique fondamental ( $S_0$ ) ; ainsi, quand une molécule absorbe de l'énergie sous forme de photons, elle passe de son niveau électronique fondamental ( $S_0$ ) à un état électronique excité  $S_1$ . Selon le principe de Franck-Condon, il n'y aura ni changement de la position nucléaire ni modification de l'orientation de spin, du fait que l'absorption du rayonnement se produit à très grande vitesse, de l'ordre de la femtoseconde ( $10^{-15}$  sec). Cette transition électronique ne peut se faire que si l'énergie fournie par le photon correspond à la différence d'énergie entre les deux niveaux  $S_0$  et  $S_1$ . D'autre part, certaines molécules excitées peuvent revenir à l'état fondamental par le biais de processus non radiatifs, la molécule retournant à son état fondamental sans émettre de radiation, et par processus radiatifs, où le retour à l'état

fondamental ( $S_0$ ) peut se faire par le biais des deux phénomènes photoluminescents - fluorescence et phosphorescence- lesquels ne se différencient que par leur durée.

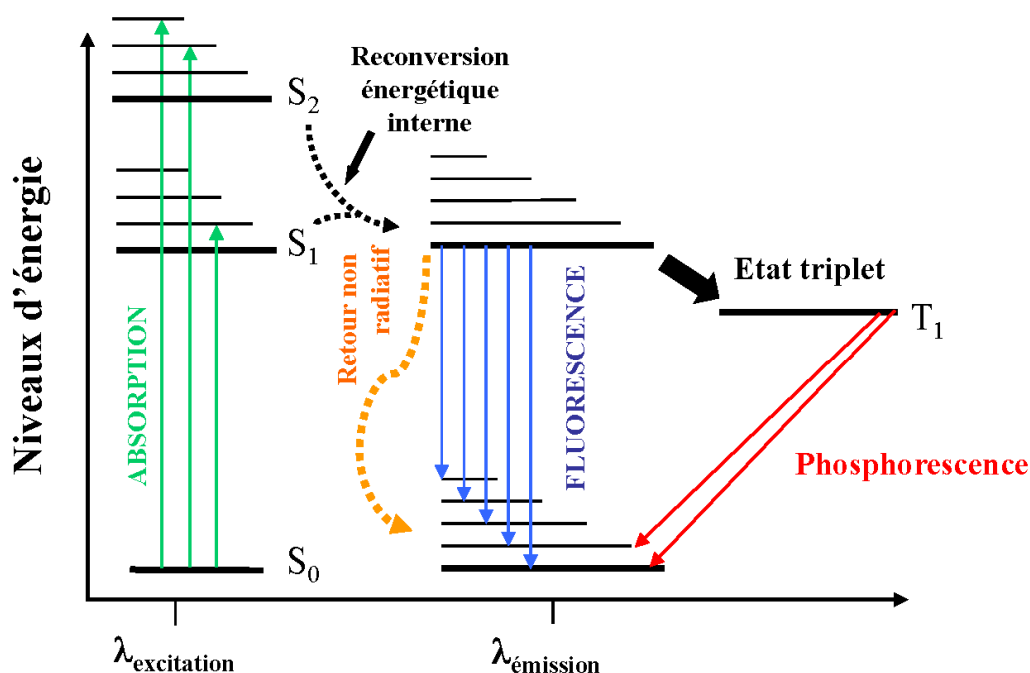


Figure 5: Diagramme de Jablonski (Jablonski, 1933)

### II.1.1. La fluorescence

La fluorescence correspond au retour d'une molécule de son état excité  $S_1$  vers son niveau fondamental  $S_0$  sans changement de multiplicité de spin. Il est admis que la durée de vie de l'état excité est inférieure à  $10^{-8}$  seconde. Etant donné que la molécule retombe dans l'état fondamental à un niveau vibrationnel plus élevé qu'avant l'excitation, du fait du phénomène de relaxation vibrationnelle dans l'état excité, la radiation émise par la fluorescence est de plus faible énergie et se situe donc à une longueur d'onde plus élevée que celle absorbée.

### II.1.2. La phosphorescence

La phosphorescence est définie comme étant l'émission d'une radiation correspondant à la transition d'un état triplet excité à un état fondamental singulet ( $S_0$ ). En effet, après la phase d'absorption, correspondant au transfert d'électron d'un niveau  $S_0$  à  $S_1$ , puis, si la relaxation

vibrationnelle est assez lente, on assiste au passage d'un état singulet  $S_1$  à un état triplet  $T_1$  énergétiquement plus stable car l'énergie vibrationnelle  $T_1$  la plus basse est inférieure à celle de  $S_1$ . Les molécules dans l'état  $T_1$  peuvent ensuite retourner directement à leur état fondamental par émission radiative sans repasser par un niveau  $S_1$ . Ce retour au niveau fondamental est de l'ordre de  $10^{-4}$  seconde à plusieurs heures, grâce à la grande stabilité de l'état triplet.

## II.2. Exploitation analytique de la spectrofluorimétrie

L'étude spectrofluorimétrique d'une solution est basée sur la mesure de l'intensité de la radiation lumineuse émise, après absorption d'un photon ; ainsi, un spectre de l'intensité de fluorescence est représenté en fonction de la longueur d'onde. En appliquant la loi de Beer-Lambert, on peut donc connaître la résultante totale des fluorescences individuelles ( $I_f$ ) des molécules de l'échantillon présente sur le trajet optique du faisceau excitateur :

$$I_f = \Phi_f I_0 \varepsilon \lambda L C$$

Avec:

$I_0$  = Intensité de la radiation excitatrice.

$C$  = Concentration de la solution ( $\text{mol.L}^{-1}$ )

$L$  = Longueur de la cuve (cm)

$\varepsilon_\lambda$  = Coefficient d'absorption molaire à longueur d'onde donné ( $\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )

$\Phi_f$  = Rendement de fluorescence de la solution

Pour les solutions, on définit le rendement de fluorescence  $\Phi_f$ , comme la fraction des nombre de photons émis ( $I_f$ ) sous les nombre de photons absorbés ( $I_a$ ). Etant  $I_a = I_0 - I_t$  où  $I_t$  représente l'intensité de la lumière transmise.

$$\Phi_f = I_f / I_a$$

Il est important de noter que l'intensité de fluorescence ( $I_f$ ) dépend à la fois de la concentration de l'échantillon ( $C$ ), de l'intensité de la radiation excitatrice ( $I_0$ ) et du rendement quantique du fluorphore, mais également du choix de la longueur d'onde excitatrice, facteur très important si l'on veut obtenir un rendement de fluorescence élevé.

En spectrofluorimétrie, la qualité des spectres dépend fortement des milieux étudiés ; par conséquent, une modification environnementale peut conduire à un changement de configuration ou de structure de la molécule, et donc à une modification de l'intensité de fluorescence. De nombreux facteurs influençant et altérant les spectres de fluorescence nécessitent d'être pris en compte et corrigés afin d'obtenir de « vrais » spectres. Les différents facteurs d'influence et d'altération peuvent être des facteurs internes (liés à la nature de l'échantillon) ou des facteurs externes (liés à l'instrumentation).

### **II.2.1. Facteurs internes**

L'intensité de fluorescence varie en fonction de la concentration de la solution (loi de Beer-Lambert). Cependant, pour des domaines de concentrations élevées, la relation établie entre l'intensité de fluorescence et la concentration n'est plus linéaire. Ce phénomène appelé effet de filtre interne, est observé pour des solutions très concentrées où l'intensité de lumière d'excitation n'est pas constante à travers la solution. Ainsi, seul un faible pourcentage de la lumière d'excitation atteint les fluorophores. Un autre effet interne se produit en raison de la réabsorption. La réabsorption se produit lorsqu'une autre molécule absorbe une partie des longueurs d'ondes émises par le fluorophore. Si c'est le cas, une partie des photons émis par le fluorophore peut être absorbée à nouveau.

### **II.2.2. Facteurs externes**

Les facteurs externes peuvent être liés à l'instrumentation, mais également à d'autres facteurs environnementaux comme la température et la nature du solvant qui ont un impact direct sur le rendement quantique.

L'augmentation de la température diminue le rendement quantique (et donc l'intensité de fluorescence) car elle favorise les chocs entre les molécules et nuit à la dissipation de l'énergie acquise par la forme excitée. La diminution du rendement de fluorescence peut atteindre 1% / °C.

La nature du solvant, sa viscosité et sa polarité, ainsi que sa capacité à former des ponts hydrogène, peuvent avoir une influence considérable sur les caractéristiques de l'intensité du signal de fluorescence.



Le pH de la solution peut aussi avoir un impact sur la fluorescence, affectant à la fois la longueur d'onde d'émission et l'intensité de fluorescence. Ce comportement est dû à l'influence du pH sur la charge et les formes de résonance du fluorophore.

La présence d'ions (ou de molécules étrangères) peut également modifier l'intensité de fluorescence (quenching), soit par transfert d'énergie des molécules excitées par collision avec les molécules de solvant par exemple, ou par formation de complexes.

Pour les facteurs liés à l'instrumentation, il faut savoir que les caractéristiques de l'intensité et la longueur d'onde varient dans le temps à chaque expérience et entre chaque expérience. De plus, aucune lampe ne possède d'intensité constante pour toutes les fréquences. Lorsque la puissance de la lampe est trop forte, un effet de photodécomposition est susceptible de se produire. Le taux de photodécomposition est proportionnel à l'intensité de la source, donc il peut être réduit en diminuant l'intensité de la source.

La diffusion de la lumière doit aussi être prise en compte. Les types de diffusion les plus significatifs dans ce contexte sont la diffusion Rayleigh et la diffusion Raman. La diffusion de la lumière par diffusion Rayleigh se fait à même longueur d'onde que la lumière incidente, alors que la diffusion Raman modifie la longueur d'onde de la lumière diffusée, habituellement vers des longueurs d'ondes plus importantes. La diffusion Raman est le résultat d'un état électronique virtuel induit par la lumière d'excitation. À partir de cet état virtuel, les molécules peuvent relaxer vers un niveau vibrationnel autre que celui de l'état vibrationnel fondamental.

### **II.3. La dérivation par fluorescence : Principe**

Les méthodes par photoluminescence sont de deux types. Les méthodes indirectes qui dépendent de la diminution (ou de la désactivation) de la photoluminescence d'un réactif causée par sa réaction avec l'analyte, et les méthodes directes basées sur la réaction de l'analyte avec un agent chélatant pour former un complexe ou un dérivé photoluminescent.

Les méthodes de dérivation par photoluminescence permettent de transformer des échantillons faiblement ou pas du tout photoluminescents en produits fortement photoluminescents. L'intérêt de former ces dérivés est d'augmenter la sensibilité de détection

de l'analyte. En effet, ces techniques présentent généralement des limites de détection qui sont de 10 à 1000 fois plus sensibles que les méthodes basées sur l'absorbance dans le domaine U.V.-visible, et leur domaine de linéarité est beaucoup plus étendu que celui des méthodes absorptiométriques. Un autre avantage des méthodes de luminescence par rapport à l'absorption est la sélectivité, car, les deux longueurs d'onde d'excitation et d'émission peuvent être choisies afin de maximiser la sélectivité. Cependant, du fait de leur grande sensibilité, les méthodes quantitatives de photoluminescence sont souvent sujettes à des interférences liées à la matrice de l'échantillon. C'est pourquoi les mesures de photoluminescence sont souvent combinées à des techniques de séparation par chromatographie ou électrophorèse capillaire.

La dérivation par photoluminescence inclut la fluorescence, la phosphorescence, mais la plupart des applications de dérivation est basée sur la fluorescence, car les phénomènes de phosphorescence sont rarement observés en solution.

La dérivation par fluorescence comprend divers procédés qui impliquent de faire réagir un composé d'intérêt pour donner un produit fluorescent de manière rapide, quantifiable, simple et spécifique.

#### **II.4. Choix des réactifs pour la dérivation et la détection par fluorescence des groupements fonctionnels**

Le choix du réactif de dérivation pour la détection fluorimétrique de chaque groupement fonctionnel étudié est basé sur différents critères.

Tout d'abord le réactif sélectionné doit être une molécule commerciale, ce qui permet de s'affranchir des nombreux problèmes liés à sa synthèse ; il doit, de préférence, former des dérivés solubles en phase aqueuse ; enfin, il doit permettre d'effectuer des réactions de dérivation qui soient rapides, fiables et adaptables à une large variété d'échantillons.

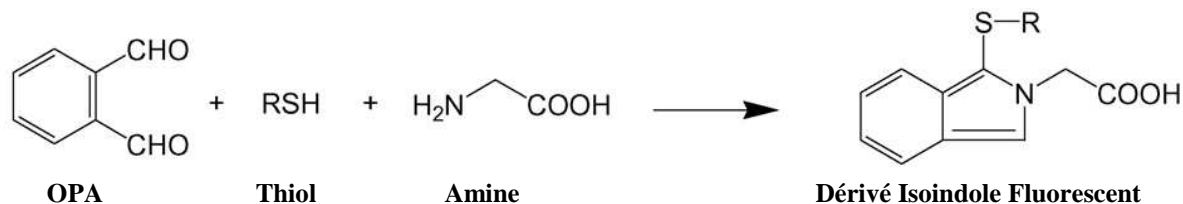
Une étude bibliographique, qui s'est voulue exhaustive, a donc été entreprise afin de sélectionner les réactifs correspondant à ces critères, et ceci pour la dérivation de chacun des groupements fonctionnels visés dans notre étude. La recherche bibliographique révèle que de nombreux réactifs ont été développés pour la quantification des molécules possédant les groupements fonctionnels que nous avons retenus dans notre recherche, à savoir pour les groupements amines, thiols et carboxyliques. Toutefois, comme montré ci-après, la majorité

de ces réactifs ont été utilisés en pré ou post-dérivation pour une séparation par chromatographie de ces molécules d'intérêt.

#### II.4.1. Groupement amine (-NH<sub>2</sub>)

Dans les années 90, de nombreux réactifs de dérivation par fluorescence ont été développés pour la détermination des composés aminés (Aminuddin and Miller, 1995). Ces réactifs ont permis d'améliorer la sensibilité et la sélectivité des réactifs jusque là utilisés pour une mesure du dérivé formé par absorptiométrie (Meulendijk et Underberg, 1990).

Un des réactifs les plus utilisés est l'OPA, qui est bien connu pour la dérivation des composés aminés (Roth, 1971 ; Jørgensen, 1979 ; Jørgensen, 1980 ; Sellner and Nealley, 1997). Cet agent fluorogénique réagit rapidement, mais uniquement avec des amines primaires et des acides aminés en milieu aqueux basique (pH 9-11) et en présence d'un thiol (RSH comme le 2-mercaptoéthanol par exemple), pour former un dérivé isoindole fluorescent (Roth, 1971) (Figure 6).

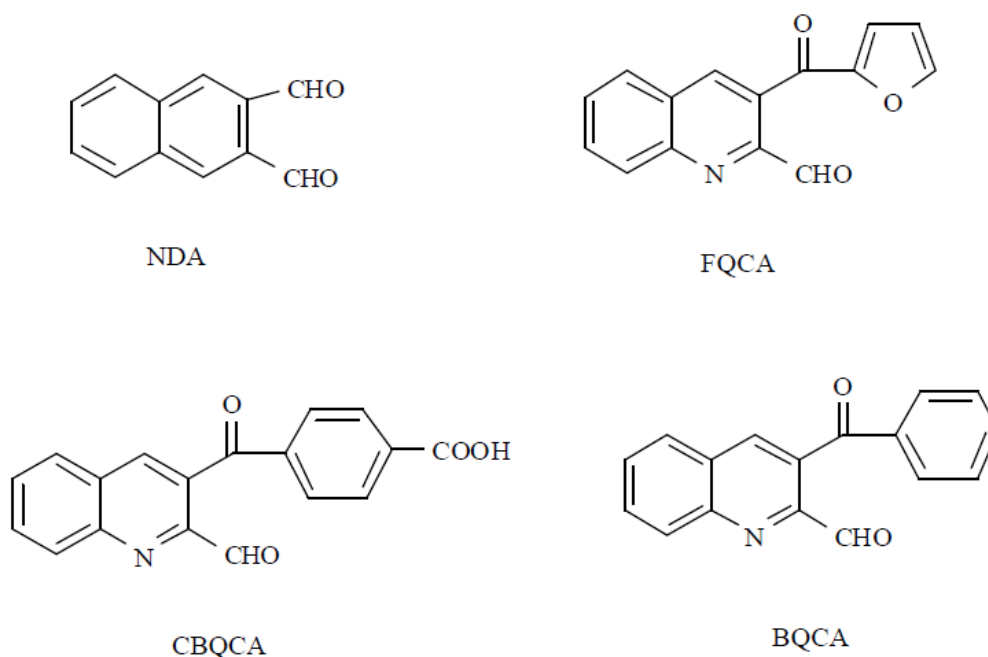


**Figure 6: Réaction de l'OPA en présence d'un thiol pour la détection d'une amine primaire ou des acides aminés.**

La réaction de dérivation est effectuée à température ambiante en 2 minutes dans un mélange de tampon borate (pH 9-11). Cette réaction est très utilisée en méthodes chromatographiques avec dérivations pré-ou post-colonne. En mode pré-colonne, la dérivation peut être réalisée soit manuellement, en contrôlant le temps de réaction et l'intervalle de temps avant l'injection, soit automatiquement, et permet une analyse très sensible et reproductible (Schuster, 1988 ; Kamisaki *et al.*, 1990 ; Graser *et al.*, 1985). D'autre part, l'OPA peut réagir avec des amines secondaires en présence de NaClO en tampon acétate. La dérivation avec le mercaptoéthanol ou le 2-éthanethiol est très instable (Fleury et Ashley, 1983) et produit des dérivés non

fluorescents, mais d'autres mercaptans tels que la N-acétyl-L-cystéine (Bowyer *et al.*, 1995 ; Nimura et Kinoshita, 1986) ou l'acide 3-mercaptopropionique (Godel *et al.*, 1984 ; Bowyer *et al.*, 1995) permettent d'avoir des dérivés fluorescents plus stables.

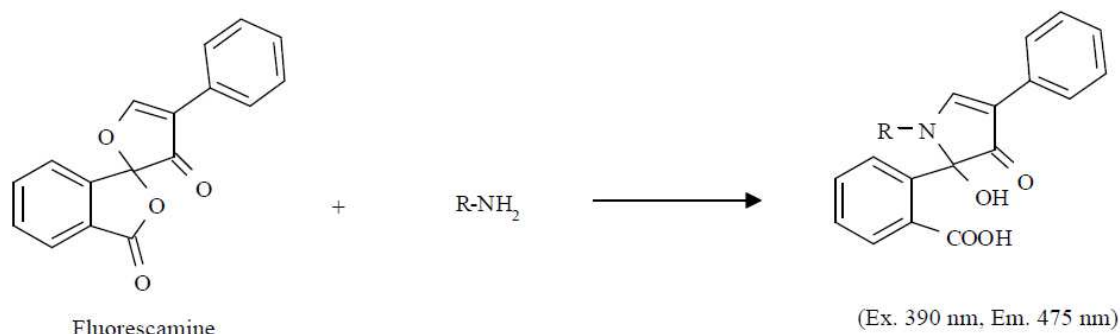
Des réactifs analogues à l'OPA tels que la 2,3-naphtalenedialdéhyde (NDA) (De Montigny, *et al.*, 1987 ; Koning, 1990) , la 3-(2-furoyl)quinoline-2-carbaldéhyde (FQCA) (Beale *et al.*, 1990), la 3-benzoyl-2-quinoline-2-carbaldéhyde (BQCA) (Beale *et al.*, 1988) et la 3-(4-carboxybenzoyl)-2-quinoline carbaldéhyde (CBQCA) (Figure 7) ont été aussi utilisés comme réactifs de dérivation des amines. Ces réactifs réagissent avec les composés aminés primaires d'une manière similaire à l'OPA, sauf que l'on utilise l'ion cyanure (KCN ou NaCN) à la place du composé thiol. L'inconvénient de ces réactifs analogues est que ces réactions nécessitent des temps de réaction plus longs (15 à 60 minutes à température ambiante) par rapport à la réaction de dérivation de l'OPA qui est se fait généralement en 2 minutes.



**Figure 7 : Réactifs analogues à l'OPA utilisés pour la dérivation de composés aminés. (d'après Toyo'oka, 1999).**

Un autre réactif très utilisé est la fluorescamine. Il s'agit d'un réactif sans fluorescence intrinsèque, mais qui offre une meilleure détectabilité des composés aminés primaires avec détection par fluorescence. Le réactif réagit avec des amines primaires et des acides aminés dans un tampon borate (pH 9,5-10) à température ambiante (Figure 8), et cette réaction est

complète en quelques minutes. De plus, la réaction des amines secondaires avec la fluorescamine donne des dérivés non-fluorescents. La fluorescamine est donc un réactif spécifique pour les amines primaires. Cependant, les dérivés fluorescents ne sont pas très stables en milieu aqueux, et la sensibilité est de 2 à 5 fois plus faible que dans la méthode utilisant l'OPA.



**Figure 8 : Réaction de la fluorescamine avec une amine primaire (d'après Toyo'oka, 1999)**

Notre choix de réactif de dérivation pour la détection des amines primaires et des acides aminés s'est porté sur l'o-phthalaldehyde (OPA), qui, en présence d'un thiol et en milieu basique, permet d'obtenir en très peu de temps un dérivé stable et détectable par fluorescence.

## II.4.2. Groupement thiol (-RSH)

### II.4.2.1. Thiols réduits

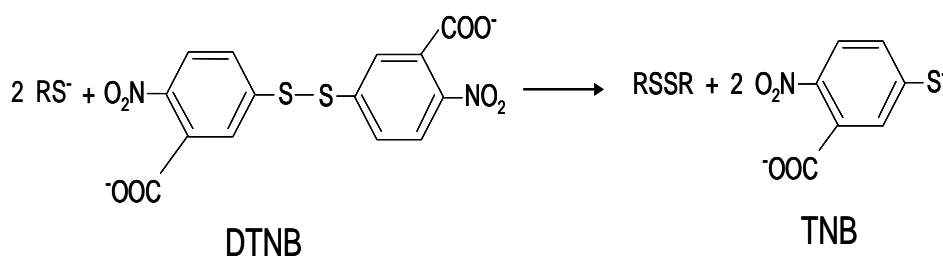
#### II.4.2.1.1. Thiols réduits totaux

Deux familles de composés permettent de réaliser une détermination de la teneur en thiols totaux dans un échantillon. Ces composés permettent la détection des thiols par spectrophotométrie UV-Visible, après une étape de dérivation.

#### 1. Les composés aromatiques à pont disulfure :

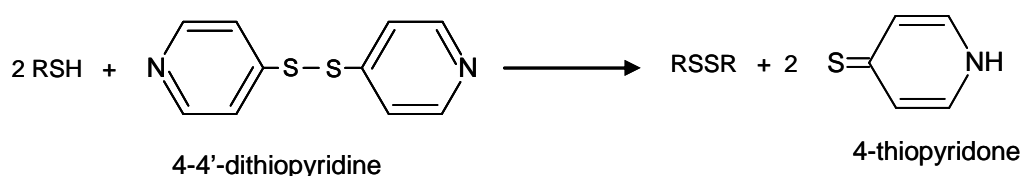
Parmi ces composés, le plus connu est l'acide 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoïque (DTNB), plus connu sous le terme générique de réactif d'Ellman.

Dans cette réaction, les thiols réduits (groupements sulfydryles -RSH) réagissent avec le DTNB pour former quantitativement le dianion de l'acide 5-thio-2-nitrobenzoïque (TNB) (Figure 9). Ce dianion est un composé de couleur jaune, dont la teneur peut être mesurée dans le domaine du visible à  $\lambda = 412 \text{ nm}$ . Ce composé possède un coefficient d'absorption molaire de  $14.15 \times 10^3 (\text{mol.L}^{-1})^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , pH = 7.3 (T=25 °C) (Eyer *et al.*, 2003).



**Figure 9: Détection de thiols par le réactif d'Ellman (Acide 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoïque)**

Une alternative au DTNB est la 4-4'-dithiodipyridine (4-DTP) qui réagit quantitativement avec les thiols pour former la 4-thiopyridone (4-TP), absorbant à  $\lambda=324 \text{ nm}$  (Grassetti et Murray, 1967) (Figure 10). A pH 7, la 4-DTP a un coefficient d'extinction molaire de  $21.40 \times 10^3 (\text{mol.L}^{-1})^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Egwim et Gruber, 2001)

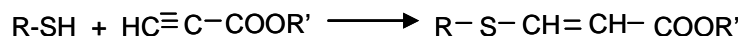


**Figure 10 : Formation de la thiopyridone en présence de composés thiols et de dithiodipyridine**

Ce réactif est donc plus sensible que le DTNB, mais son absorbance à 324 nm peut être gênée par la présence d'autres composés absorbant dans ce domaine.

## 2. Les alcynes :

Très récemment, la réaction des composés thiols avec les esters de l'acide propiolique a été utilisée pour la quantification par spectrophotométrie des thioacrylates résultants (Owen, 2008).



Cette réaction est très rapide et s'effectue en conditions douces à pH 6,8. Le coefficient d'extinction molaire varie suivant les thioacrylates formés, mais s'échelonnent autour de  $12.50 \times 10^3 \text{ (mol.L}^{-1}\text{)}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , pour une détection à  $\lambda = 285 \text{ nm}$ . La limite de détection n'est donc pas améliorée par rapport au DTP, mais la sélectivité de la réaction envers les thiols et les dithiols est prometteuse. Un autre avantage réside dans le pouvoir réducteur des alcynes : ainsi, les étapes de réduction et de « labelling » sont réalisés simultanément.

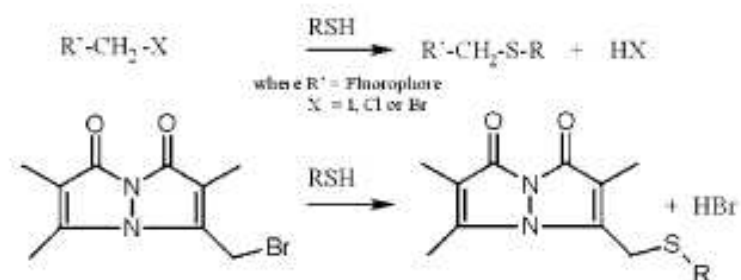
## II.4.2.1.2. Thiols réduits individuels

Au cours de ces dernières années, plusieurs composés pour la dérivation des thiols ont été développés et utilisés comme réactifs de pré ou de post-dérivation pour des analyses chromatographiques (HPLC) avec détection par spectrophotométrie ou spectrofluorescence. La figure 5 recense les familles des réactifs les plus couramment utilisées, ainsi que les voies de réaction communes concernant la dérivation et la détection des thiols.

Dans la famille des haloacétamides (Figure 11a), un réactif très utilisé est le monobromobimane (mBBBr) lequel est faiblement fluorescent, et réagit en présence de thiols à pH 8,0 pour former en 5 minutes un thioéther fortement fluorescent, détectable à 450 nm ( $\lambda_{\text{ex}} = 380\text{nm}$ ) et stable à température ambiante. Le monobromobimane a été utilisé pour la détection des thiols présents dans les protéines (Kosower et Kosower, 1995 ; (Bass *et al.*, 2004) et, en combinaison avec l'HPLC, pour quantifier les thiols de faible poids moléculaire (Graham *et al.*, 2003). Le mBBBr demeure toutefois délicat à utiliser puisque c'est un composé photosensible, qui forme des sous-produits fluorescents qui interfèrent avec la détermination des thiols et obligent donc à travailler dans l'obscurité. De plus, différents auteurs ont signalé des interférences avec les réducteurs à base de thiol et de phosphines (Newton *et al.*, 1981), composés communément utilisés pour la détermination des thiols oxydés.

Les composés de la famille des maléimides (Figure 11b) sont souvent utilisés dans la dérivation des composés thiols en chromatographie par dérivation en pré-colonne particulièrement, mais des réactions secondaires peuvent se produire entraînant des erreurs dans la quantification des dérivés (Tang *et al.*, 2002).

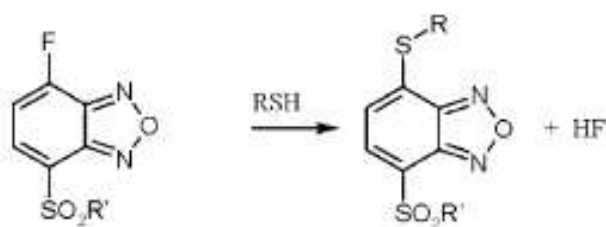
### A Haloacetamides



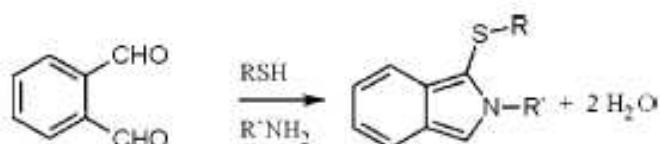
### B Maleimides



### C Benzoxadizoles



### D Isoindoles



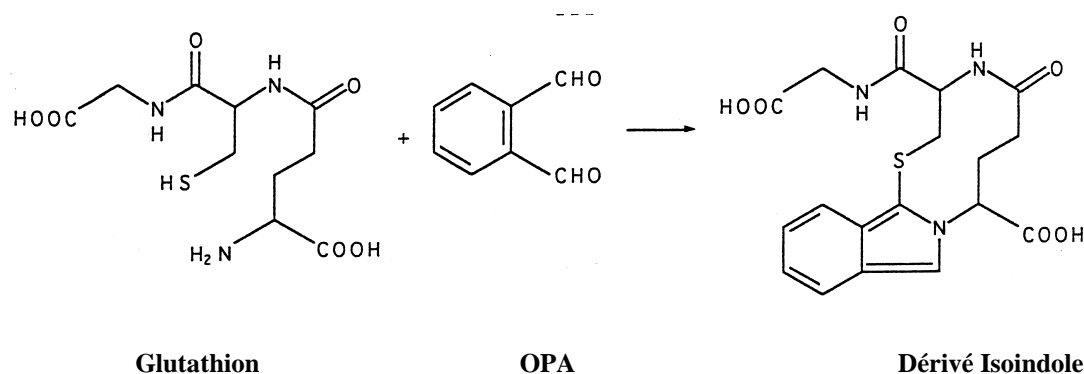
**Figure 11: Réactifs utilisés pour la dérivation de thiols et leur détection par fluorescence.**  
(d'après Lock *et al.*, 2002)



D'autre part, l'ammonium benzofurazane-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole-4-sulfonate (SBD-F) et le 4-aminosulfonyl-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole (ABD-F) sont également des réactifs fluorescents possédant un groupement halogène utilisés pour la dérivation de thiols, appartenant à la famille de benzoxadiazoles (Figure 11c), lesquels ne présentent pas de réactions d'interférence avec les phosphines; il est donc possible de réaliser la réduction des disulfures et la dérivation des thiols simultanément (Kirley, 1989 ; Chin et Wold, 1993). Malheureusement, la dérivation des thiols avec ces réactifs exige des températures de réaction élevées (pH de 8,5 et 60 °C) ainsi que des temps d'incubation importants (> 1 h). Dans ces conditions, il y a un risque de régénération de thiols, ce qui induit de possibles erreurs de quantification.

Une attention particulière a été portée sur la famille des dialdéhydes (Figure 11d), et principalement sur l'o-phthalaldéhyde (OPA), réactif utilisé habituellement pour la dérivation des amines et des acides aminés primaires en présence d'un composé thiol permettant de former un dérivé isoindole fluorescent. Ce réactif peut également être employé pour la dérivation sélective de thiols (Jocelyn et Kamminga, 1970; Mopper et Delmas, 1994; Parmentier *et al.*, 1998). L'OPA ne présente pas d'autofluorescence, et réagit en milieu basique en présence d'une amine avec un thiol pour former un dérivé en 5 minutes, détectable à 455 nm ( $\lambda_{exc} = 335nm$ ) et stable à température ambiante.

Un autre avantage de la méthode OPA est la détection des thiols hétérobifonctionnels (comme le glutathion), qui contiennent à la fois des groupes aminés et thiols dans leur structure, (Figure 12). La réaction de l'OPA avec ce type de thiol, permet de former un isoindole fluorescent et mesurable à 440 nm (Senft *et al.*, 2000), donnant ainsi un degré élevé de sélectivité pour le glutathion par rapport à d'autres thiols.



**Figure 12 : Schéma de réaction de l'OPA en présence du glutathion (d'après Parmentier *et al.*, 1998)**

Nous avons donc sélectionné l'OPA comme réactif de dérivation des thiols, puisqu'en comparaison des autres méthodes de détection, l'utilisation de ce composé est beaucoup plus simple, économique et rapide. De plus, par rapport à la méthode standard (méthode Ellman) cette méthode permet la quantification des thiols réduits ainsi que des thiols oxydés séparément. A cet effet, des réducteurs sont nécessaires afin de réduire les thiols oxydés à thiols réduits, forme chimique des thiols qui peut être dérivé par l'OPA et ensuite détecté par fluorescence.

#### II.4.2.2. Réduction des thiols oxydés

Il faut se rappeler que les thiols dans l'environnement peuvent se présenter sous la forme de thiols réduits ou sous la forme de thiols oxydés, et que de part leur réactivité, les thiols réduits se transforment très facilement en thiols oxydés. Cette oxydation conduit donc à la formation de disulfures (Figure 13), c'est-à-dire deux molécules de thiol unies par un pont sulfure. De plus, les thiols peuvent s'oxyder aussi en présence de métaux, du fait de la formation de complexes thiol-métal, ce qui rend le groupe thiol moins accessible à l'OPA et l'amine, empêchant donc, la détection totale en thiols. Par conséquent, l'utilisation d'un agent réducteur est nécessaire, afin de casser les liaisons entre les ponts disulfures ou celles entre les thiols et les métaux (ponts S-Métal).

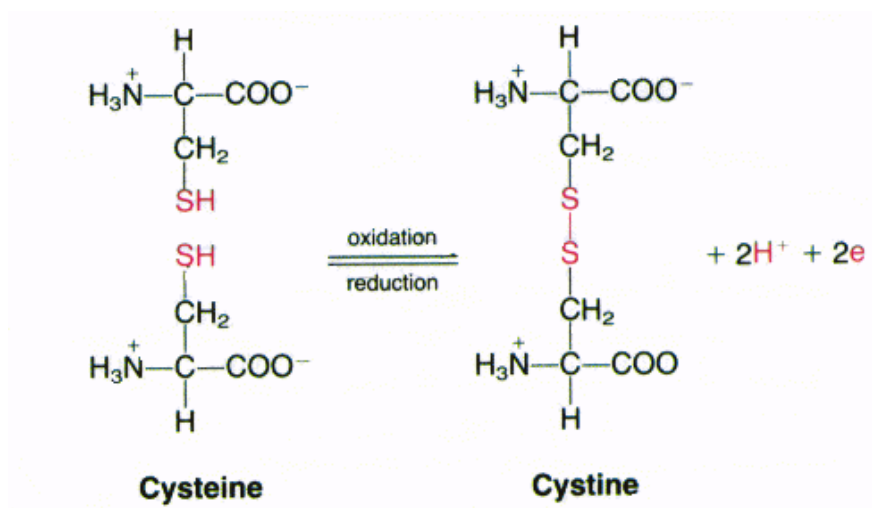


Figure 13: Formation de ponts disulfure

Un réducteur puissant possède généralement un groupement nucléophile, fortement attracteur du soufre. Les réducteurs les plus utilisés sont, dans l'ordre décroissant de leur pouvoir nucléophile envers le soufre (Hansen et Winther, 2009) :



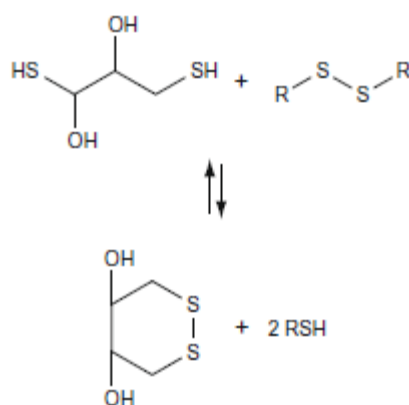
Une étude bibliographique a été effectuée afin de connaître les conditions opératoires de chacun de ces réducteurs.

#### *II.4.2.2.1. Les hydrures*

Le Borohydrure de sodium (BH) est extrêmement réactif et un agent réducteur fort en raison de la haute S-nucléophilie de l'ion borohydrure. Ce réactif doit être préparé juste avant utilisation pour éviter sa décomposition. Plusieurs études ont montré que le BH est en mesure de réduire quantitativement les ponts disulfures des protéines avec ou sans la présence d'agents dénaturants. En général, la réduction des disulfures de protéines est faite avec  $1\text{mol.L}^{-1}$  de BH à pH 12, et qu'elle est totale après 30 min à 50 °C. Comme de l'hydrogène est formé pendant la réaction, les solutions ont tendance à mousser, mais cela peut être évité en ajoutant de l'octanol ou de l'hexanol.

#### *II.4.2.2.2. Les thiols*

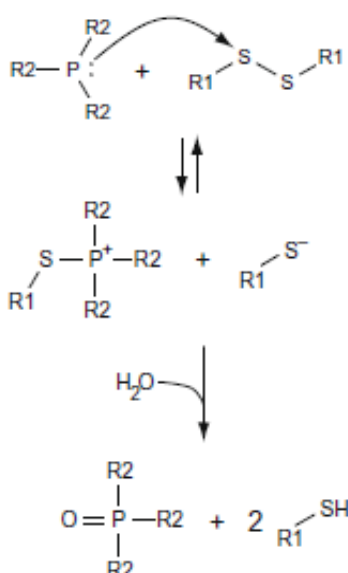
Parmi les réducteurs communément utilisés, on trouve les thiols-disulfures eux-mêmes (Figure 14). La réaction suit le mécanisme d'échange de l'anion thiolate. Le principal avantage de ce réducteur est le degré élevé de spécificité, ce qui signifie que seuls les disulfures sont atteints, laissant les thiols disponibles pour la détection. Le principal inconvénient est que les groupes SH des réducteurs d'échange entrent en concurrence directe avec les thiols à analyser. D'autre part, ces réducteurs sont particulièrement sensibles à l'oxydation, et par conséquent toutes les solutions nécessitent d'être maintenues dans un milieu exempt d'oxygène (lorsque c'est possible) et doivent contenir des agents chélateurs métalliques tels que l'EDTA.



**Figure 14 : Réduction de disulfures avec le Dithiothréitol (DTT)**

#### II.4.2.2.3. Les phosphines

Les trialkylphosphines réduisent quantitativement les disulfures en thiols en deux étapes. Comme le montre la figure 15, dans une première étape, la phosphine attaque la liaison S-S formant ainsi un sel de thiophosphonium. Ensuite, par hydrolyse, le deuxième thiol est libéré et l'oxyde de phosphine est formé (l'étape d'hydrolyse rend la réaction irréversible). La réduction des ponts disulfures va se faire de façon stœchiométrique, c'est-à-dire qu'une mole de réactif réduit une mole de disulfure (Ruegg et Rudinger, 1977; Friedman *et al.*, 1980; Kirley, 1989).



**Figure 15 : Mécanisme de réaction des trialkylphosphines**

#### II.4.2.2.4. Les cyanures et les sulfites

D'autres agents réducteurs alternatifs tels que les ions sulfites ( $\text{SO}_3^-$ ) et les ions cyanures ( $\text{CN}^-$ ) peuvent être utilisés. Cependant, la réduction avec ces agents est rarement effectuée, puisqu'elle est très lente et qu'elle nécessite des catalyseurs afin d'assurer une réduction efficace (Jocelyn, 1987).

L'étude bibliographique et des essais de réduction préliminaires nous ont orienté vers l'utilisation des trialkylphosphines. En effet, celles-ci présentent les avantages suivants par rapport aux autres réducteurs étudiés :

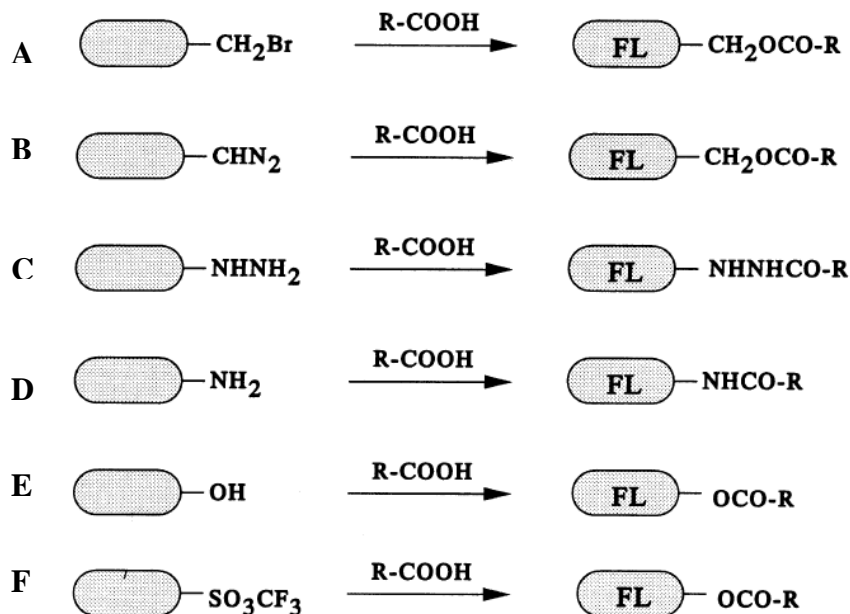
- l'étape de réduction est rapide : 80% des thiols oxydés sont réduits en moins de 10 minutes ;
- leur efficacité est meilleure par rapport aux autres réducteurs (80% des thiols oxydés sont réduits en 30 minutes par les dithiols et les hydrures) ;
- enfin, ces composés ne présentent pas, *a priori*, des problèmes d'interférence avec l'OPA, et ne génèrent ni gaz ni mousse (Rizzo *et al.*, 1998), ce qui permet d'éviter des procédures supplémentaires au moment de la réduction.

Les principales trialkylphosphines utilisées pour la réduction des thiols oxydés sont la tributylphosphine (TBP), le tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) et le tris(hydroxypropyl) phosphine (THP). Parmi ces réducteurs, nous avons opté pour le TBP, car, malgré leur solubilité nulle dans l'eau, il présente très peu d'interférences avec les tampons utilisés. En effet, le TCEP est connu par sa bonne solubilité en milieu aqueux ; il a toutefois été signalé comme instable dans des tampons phosphate et borate, et particulièrement entre pH 7 et 8. La raison de cette déstabilisation en milieu phosphate n'est pas connue (Han et Han, 1994; Burns *et al.*, 1991). Le THP est un autre réducteur très soluble dans l'eau mais difficile à trouver dans le commerce.

### II.4.3 Groupement carboxylique (-COOH)

De nombreux réactifs fluorescents peuvent être trouvés dans la littérature. Le choix du réactif dépend de la modification chimique du groupe carboxyle. Comme le montre la figure 16, la modification de l'acide carboxylique est généralement associée à un groupe fonctionnel réactif, tel que l'halogénoalkyle ( $-\text{CH}_2\text{X}$ ), l'hydrazine ( $-\text{NHNH}_2$ ) et l'amine ( $-\text{NH}_2$  et  $-\text{NHR}$ ).

Ces réactions ont parfois besoin de l'activation de l'acide carboxylique avant la dérivation avec les réactifs.



**Figure 16 : Les principaux types de réactifs pour la dérivation de l'acide carboxylique. A. Bromoalkyl, B. Diazométhane, C. Hydrazine, D. Amine, E. Alcool, F. Sulfonate. (d'après Toyo'oka, 2002)**

Le premier bromoalkyl utilisé comme réactif de dérivation par fluorescence des acides carboxyliques fut le 4-bromométhyl-7-méthoxycoumarin (Br-MMC), synthétisé par Baker et Collins en 1949 (Baker et Collis, 1949). Il a été utilisé pour la détection d'une grande variété d'acides carboxyliques aliphatiques et aromatiques, des herbicides, et des médicaments. La réaction de dérivation des acides carboxyliques avec les composés bromométhylés se produit dans des solvants aprotiques tels que l'acétone et l'acétonitrile en présence d'un catalyseur basique (par exemple K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) et d'un agent de transfert de phase (par exemple 18-crown-6) (Yoshida *et al.*, 1986; Wolf et Korf, 1990; Yoo et McGuffin, 1992). En général, la réaction de dérivation est effectuée à 60 °C pendant 30-60 min pour les acides mono-carboxyliques, et à 80 °C pendant 60 min pour les acides dicarboxyliques.

L'utilisation de catalyseurs et d'agents de transfert (18-crown-6) a été aussi utilisée dans d'autres réactions de dérivation en présence de réactifs sulfonates (Yasaka *et al.*, 1990) à température ambiante.

D'autres réactifs de type diazométhane et hydrazine permettent la dérivation des acides carboxyliques à température ambiante en milieu aqueux. Cependant, les temps de réaction pour obtenir un rendement constant de dérivation sont très longs.

Les amines primaires et secondaires ainsi que les alcools ont également été utilisées pour la dérivation des acides carboxyliques à température ambiante en milieu aqueux. En général, les réactions avec ces types de réactifs nécessitent l'activation du carbone portant le groupement – OH de l'acide carboxylique avec un carbodiimide avant la réaction de dérivation avec les amines ou les alcools (Van DenBeld *et al.*, 1991; Lingeman *et al.*, 1988). A la différence des amines qui permettent la dérivation en peu de temps, la réaction de dérivation avec les alcools requiert une étape de chloration, longue et donnant lieu à des réactions secondaires.

Après l'étude bibliographique des différents réactifs de dérivation des acides carboxyliques, nous avons décidé de travailler avec les amines comme réactifs de dérivation, puisqu'elles sont les plus avantageuses en termes de stabilité, réactivité et solubilité en milieu aqueux. Parmi les différentes amines utilisées, nous avons choisi une amine de type aliphatique qui avait déjà été signalée par Kobayashi et Chiba (1994) comme réactif efficace pour la dérivation des acides carboxyliques.

## **II.5. Méthodes d'optimisation**

Afin de déterminer les conditions opératoires optimales en un minimum d'expériences pour les différentes méthodes d'analyses proposées, des plans de criblage et/ou d'expérience ont été employés selon les cas.

### **II.5.1. Plan de criblage**

Les plans de criblage sont basés sur des plans expérimentaux permettant d'identifier les facteurs ayant une influence prépondérante sur les mécanismes étudiés. Ils sont particulièrement mis en œuvre lorsque le nombre de paramètres est important (Fisher, 1925 ; Plackett et Burman, 1946 ; Box *et al.*, 1961a, 1961b).

Ils précèdent la mise en place de plans d'expériences, qui, eux, visent à optimiser les paramètres qui auront été mis en évidence dans le plan de criblage.

L'estimation des effets des facteurs, étudiée dans un plan de criblage, est associée avec une estimation des interactions à 2 et 3 niveaux d'interaction (Lenth, 1989 ; Ye *et al.*, 2001).

### II.5.2. Plan d'expérience

Les plans d'expériences sont applicables à de nombreuses disciplines ; ils permettent d'organiser au mieux les essais en obtenant le maximum de renseignements avec le minimum d'expériences. Pour cela, la méthode des plans d'expériences se base sur deux notions essentielles, celle du domaine expérimental et celle de la modélisation mathématique des réponses étudiées.

La valeur des réponses étudiées dépend de plusieurs paramètres. Pour chacun de ces paramètres, qu'on appellera facteurs, un domaine de variations est défini. A l'intérieur de ce domaine, les valeurs données aux facteurs peuvent prendre différents niveaux. L'ensemble des domaines de variations de chaque facteur est appelé domaine des facteurs. Chaque élément de ce domaine des facteurs représente un ensemble de conditions expérimentales. On appelle domaine expérimental le sous-ensemble du domaine des facteurs contenant les expériences à réaliser.

Afin de rendre comparables les effets des différents facteurs qui ne sont pas forcément exprimés dans les mêmes unités, il est nécessaire de faire une opération sur les facteurs qui va nous permettre de travailler avec des variables sans dimension, appelées variables codées (Droesbeke *et al.*, 1997).

La transformation la plus utilisée est :

$$X_j = (U_j - U_j^0) / \Delta U_j$$

avec

$X_j$  = valeur de la variable codée  $j$  ;

$U_j$  = valeur de la variable naturelle  $j$  ;

$U_j^0$  = valeur de la variable naturelle  $j$  au centre du domaine ;

$\Delta U_j$  = variation de la variable réelle  $j$  associée à une variation d'une unité de la variable codée correspondante.



En considérant ces variables codées, le domaine expérimental est défini comme étant le domaine autour d'un point central (appelé le centre d'intérêt). Il s'agit d'un domaine sphérique.

L'ensemble des expériences à réaliser est représenté soit par une matrice d'expérience si l'on considère les variables codées, soit par un plan d'expérimentation si l'on considère les facteurs. Dans les deux cas, cela correspond à un tableau constitué de : N lignes, correspondant aux N expériences ; et de k colonnes, correspondant aux k variables étudiées. Contrairement à la matrice d'expérience, le plan d'expérimentation est directement utilisable par l'expérimentateur et c'est pourquoi nous utiliserons plus particulièrement ce dernier.

Les réponses expérimentales mesurées (notées Y) sont l'intensité de fluorescence et la stabilité dans le temps du dérivé formé. Ces réponses expérimentales servent à valider le modèle postulé et lui servent d'entrées pour le calcul de la réponse prévisionnelle.

Le modèle utilisé dépend du type de problème étudié. Le modèle doit représenter la réponse expérimentale étudiée dans le domaine expérimental d'intérêt et permettre d'obtenir une estimation de la valeur de la réponse étudiée de qualité acceptable. Les modèles utilisés sont des modèles empiriques, et parmi eux, nous avons opté pour un modèle polynomial du deuxième degré. Il établit la relation entre la variation de la réponse,  $\eta$ , et la variation des facteurs X. Il est de la forme :

$$\eta = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_k X_k + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \dots + \beta_{kk} X_k^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \dots + \beta_{k-1,k} X_{k-1} X_k$$

Avec :

k : nombre de facteurs ;

$\beta_0$  : le coefficient constant ;

$\beta_i, \beta_{ii}, \beta_{ij}$  : les coefficients des termes de degré 1, des termes de degré 2 et des termes produit respectivement.

Pour estimer les coefficients de ce modèle, nous avons besoin d'un ensemble d'expériences bien étendu dans le domaine. La qualité de l'estimation des coefficients et de la prévision, dépend seulement du choix des points expérimentaux. Parmi les différentes matrices

d'expériences existantes, nous avons choisi une matrice de Doehlert car c'est la meilleure matrice pour le domaine sphérique défini par les facteurs (Droesbeke *et al.*, 1997).

Pour chaque réponse étudiée (Y), les coefficients ( $\beta_i$ ,  $\beta_{ii}$ ,  $\beta_{ij}$ ) sont calculés en utilisant une régression multilinéaire. Le calcul a été effectué avec le logiciel Nemrod-W (LPRAI, Marseille, France), développé pour la construction et le traitement des matrices d'expériences (Lewis *et al.*, 1999). Le modèle est validé par l'analyse de la variance (ANOVA) en différents points du domaine. Lorsqu'il est validé, qu'il représente bien le phénomène étudié dans le domaine expérimental, le modèle peut être utilisé pour prédire en n'importe quel point de ce domaine, la valeur de la réponse étudiée. Les réponses prévisionnelles issues du modèle, sont représentées graphiquement par des courbes d'isoreponses dans un espace à deux dimensions et par des représentations en trois dimensions. Le nombre de facteurs étant supérieur à deux, les graphiques sont des coupes d'une sphère où l'on visualise la réponse prévisionnelle en fonction de deux facteurs et où les autres facteurs sont maintenus fixes.

## **II.6. Introduction aux techniques d'automatisation**

Ces dernières années, la demande d'analyses et le nombre croissant des tests analytiques nécessaires dans des domaines comme la santé, l'environnement et les aliments suscitent la nécessité de l'automatisation des processus analytiques.

L'automatisation peut remplacer l'activité humaine sur des tâches pénibles et même dangereuses pour l'opérateur, fournissant une plus grande reproductibilité puisque l'influence des facteurs humains est minimisée, et augmentant la vitesse d'analyse, car il est possible de réaliser un grand nombre d'analyses dans un minimum de temps. Les techniques d'analyse en flux et en microplaque permettent également de réduire la consommation de produits chimiques, avec des avantages environnementaux et économiques. Ceci, combiné avec la disponibilité commerciale des instruments et les avantages économiques à moyen et long terme dans les laboratoires sont les raisons de la hausse de ces systèmes d'analyse automatisés.

## II.6.1. Technique d'analyse en microplaque

### II.6.1.1. Généralités sur la technique en microplaque

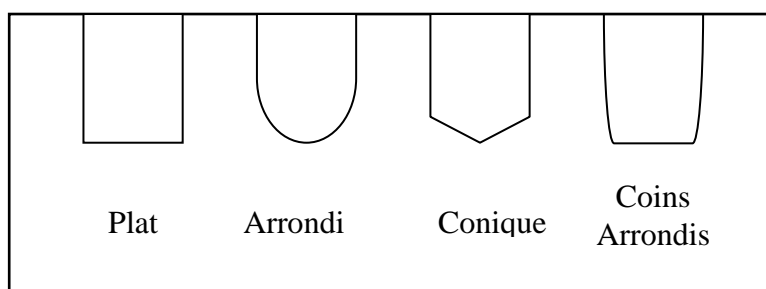
La première microplaque a été créée en 1952 par G. Takatsky, qui a fabriqué 6 colonnes de 12 puits (soit 72 puits) en acrylique (Mann, 1999). Cependant, l'utilisation de la microplaque a véritablement commencé dans les années 1950 lorsque John Liner aux Etats-Unis présente une version commerciale.

La microplaque est composée de multiples «puits» utilisés comme petits tubes à essai, utilisés pour un des trois objectifs: production, stockage ou analyse des réactifs et/ou échantillons. La microplaque est devenue un outil standard dans la recherche analytique et clinique particulièrement dans le dosage immuno-enzymatique (test ELISA). Elle a été récemment utilisée dans le domaine environnemental permettant de quantifier la réactivité des composés organiques d'échantillons aqueux de matières organiques afin d'évaluer quantitativement leur devenir dans le sol et les impacts environnementaux potentiels (Dudal *et al.*, 2006).

Les microplaques sont fabriquées en différentes couleurs et matériaux, mais ce sont les plaques en polystyrène et polypropylène qui sont les plus utilisées. Le polystyrène permet d'avoir un format en plastique pratique et bon marché et est réservé principalement pour l'utilisation des échantillons aqueux ; il n'est pas compatible avec les solvants organiques et les acides et bases fortes utilisées dans la synthèse chimique. Pour ces applications, des plaques en polypropylène répondent à ce besoin.

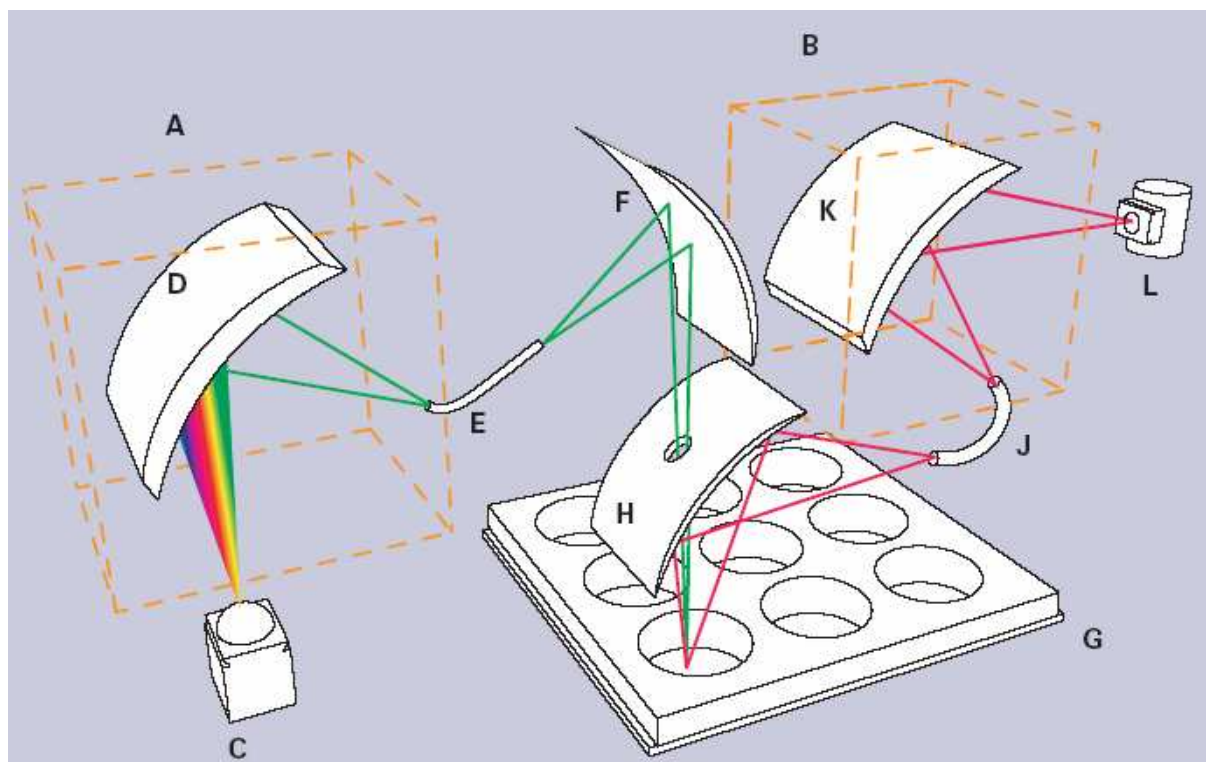
Les microplaques ont évolué au fil des ans en réponse à de nouvelles applications et présentent aujourd'hui de nombreuses variétés de forme et fond. Fondamentalement, les microplaques ont une forme ronde ou carrée et quatre types de puits sont disponibles: fonds plats, ronds, coniques et à coins arrondis (Figure 17). Les microplaques à fonds plats sont traditionnellement utilisées pour des applications nécessitant une lecture optique car la transmission de la lumière est maximale grâce à ce type de fond. Les fonds arrondis (aussi appelé fond U) sont les plus efficaces pour un mélange efficace de réactifs, car ils reproduisent la forme d'un tube à essai. Les microplaques à fond conique (également appelé fond V) sont adaptées pour la décantation de petites particules et aussi pour une récupération efficace de petits volumes d'échantillons. Les fonds à coins arrondis (parfois appelé fond C)

résultent d'une modification de plaques à fonds plats dans lesquels on obtient de meilleures performances dans les applications nécessitant un mélange de réactifs ou un lavage de la microplaque. De plus, elles offrent une bonne transmission de la lumière. Les puits des microplaques peuvent typiquement contenir un volume de 0,3 à 0,4 ml, en fonction de la géométrie de la forme et du fond du puits.



**Figure 17 : Les quatre géométries de fonds de puits disponibles sur les microplaques: fonds plats (fond F), fonds ronds (fond U), fonds coniques (fond V), fonds à coins arrondis avec un fond plat (fond C).**

La lecture de la fluorescence en microplaques est effectuée par des lecteurs à microplaques (Figure 18). Les principaux composants d'un appareil de mesure de fluorescence de microplaques sont la source d'excitation, les filtres ou les monochromateurs, le transducteur et la cellule de mesure.



**Figure 18: Fonctionnement d'un lecteur microplaque (d'après la brochure Spectramax, Gemini XS Molecular Devices).**

Un exemple d'un lecteur microplaque est présenté dans la figure 18. Il utilise un monochromateur d'excitation (A) et un monochromateur d'émission (B). Le faisceau lumineux de la lampe (C) est envoyé sur un réseau de diffraction (D) qui permet de sélectionner la longueur d'onde d'excitation désirée. La lumière transmise par une fibre optique (E) est réfléchiée sur un miroir de focalisation (F) et dirigée vers le centre du puits de la microplaque (G). La fluorescence résultante revient sur un miroir de focalisation (H). Après passage par une seconde fibre optique (J), le faisceau est dispersé par le réseau de diffraction (K). Le rayonnement de fluorescence à la longueur d'onde d'émission choisie est détecté par un tube photomultiplicateur (L).

## II.6.2. Technique d'analyse en flux

### II.6.2.1. Généralités sur les techniques en flux

Les techniques en flux simplifient considérablement le traitement analytique avec des économies importantes de réactifs et de temps, permettant une grande fréquence des analyses,

avec la réduction conséquente de main d'œuvre, des coûts de l'analyse et de production de déchets. De plus, ces techniques permettent une utilisation sur site, et ainsi permettent d'effectuer une analyse en continu tout en supprimant les biais dus aux différentes manipulations nécessaires pour une analyse en laboratoire : prélèvement, conditionnement, stockage, transport, prétraitement.

Au cours de ces dernières années, différents techniques d'automatisation ont été développées ; les différences entre chaque technique proviennent de la mise en flux du système, du mode d'injection des échantillons et des réactifs, du mode de mélange du milieu réactionnel et des modes de détection. La figure 19 montre les différents modules pouvant être utilisés, suivant les modes de mises en flux, ainsi que quelques modes de détection. Au sein des automates, l'appareil de détection est considéré comme couplé à la chaîne de module et n'influence pas l'appellation de la technique en flux utilisée. Une liste des différentes techniques développées au cours des années est présentée ci-dessous :

*Analyse par injection en flux « FIA »*

*Analyse par injection séquentielle « SIA »*

*Analyse par flux multi commuée « MCFA »*

*Analyse par injection en flux multi seringue « MSFIA »*

*Analyse en flux multi pompe « MPFS »*

Le développement de ces techniques de flux peut être considéré en deux étapes bien distinctes. Dans la première étape, le système peut être contrôlé facilement de façon manuelle uniquement, ce qui correspond aux techniques SFA et FIA, et dans la seconde étape l'utilisation des ordinateurs est presque indispensable, ce qui répond aux caractéristiques des systèmes d'analyse SIA, MCFA, MSFIA et MPFS.

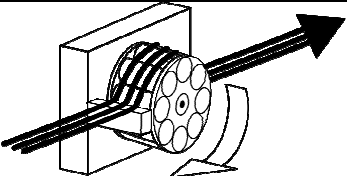
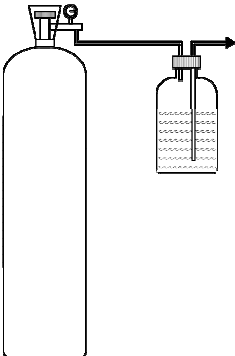
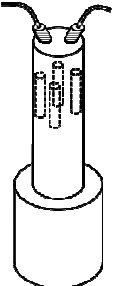
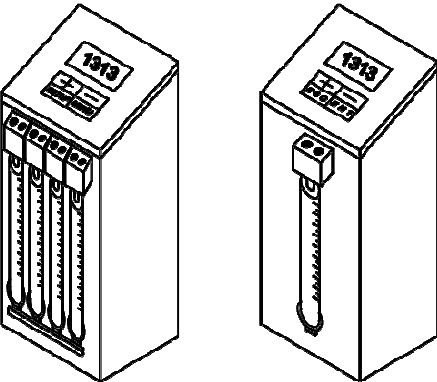
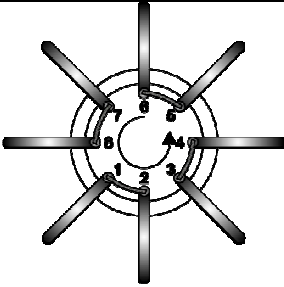
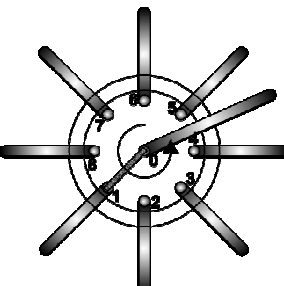


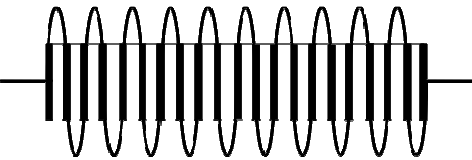
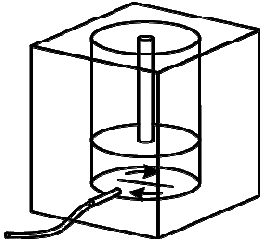
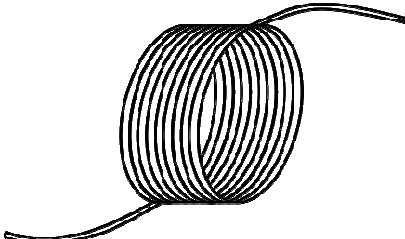
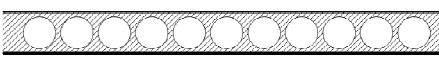
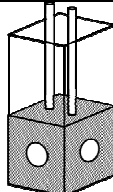
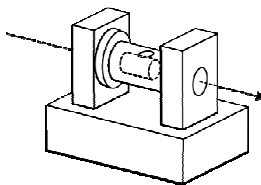
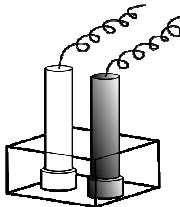
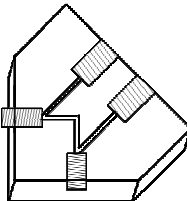
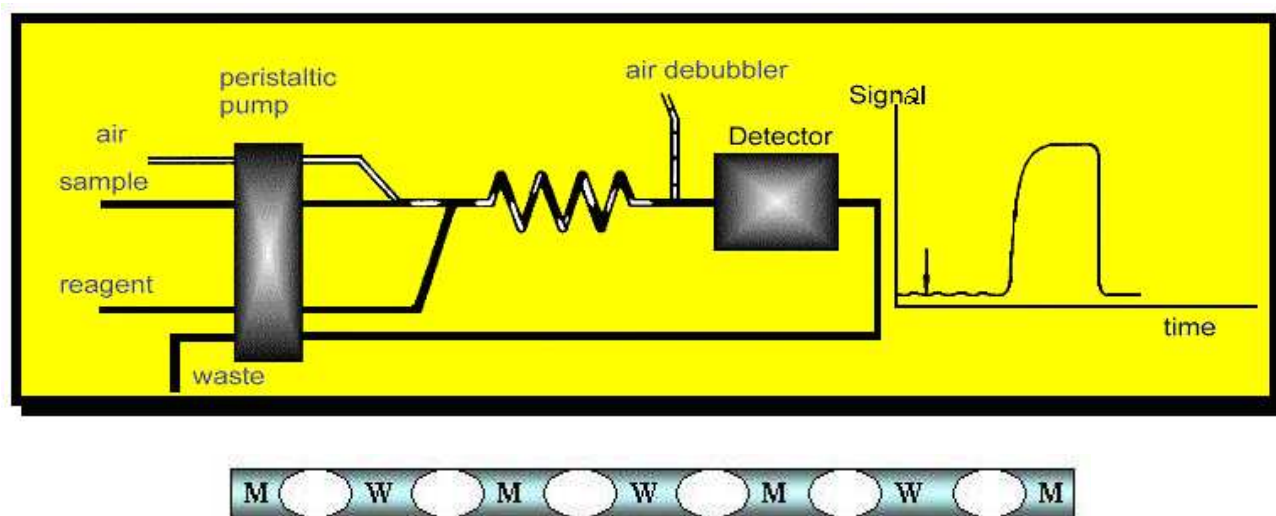
Systèmes de mise en flux	Mode d'injection	Réacteur de mélange	Détection
 Pompe péristaltique  Pression gazeuse  Pompe multi piston  Burette Multi-seringue et mono-seringue	 Valve d'injection  Valve de sélection  Point de confluence multivoies	 Réacteur à noeud  Réacteur sinueux  Réacteur à agitation mécanique  Réacteur en boucle  Réacteur à billes enfilées	 Cellule micro flux (spectrophotométrie et fluorimétrie)  Spectrométrie d'absorption atomique  Potentiométrie  Cellule en flux : fluorimétrie et spectrophotométrie

Figure 19: Liste non exhaustive des différents modules utilisés pour la mise en flux, l'injection, le mélange et la détection (Vanlout, 2006)

L'analyse en flux segmenté « SFA » a été décrite par Skeggs en 1957 et est l'une des premières techniques en flux utilisée en laboratoire. Le SFA est un ensemble de tuyaux dans lesquels circulent l'échantillon et les réactifs. Pour assurer l'homogénéité chimique de l'injection, sans risque de contamination entre échantillons consécutifs, des bulles d'air sont aspirées grâce à une pompe péristaltique et sont introduites dans le système. Les bulles évitent la dispersion de l'échantillon et facilitent la génération de flux turbulents, afin de faciliter le mélange de l'échantillon et des réactifs dans le segment entre deux bulles. Ces bulles doivent être éliminées avant d'atteindre le détecteur. La figure 20 présente un exemple d'analyse en flux segmenté (SFA).

Toutefois, l'introduction de bulles d'air provoque une série d'inconvénients tels que la compressibilité de la phase gazeuse (qui affecte le signal) et la faible efficacité de séparation des phases en ligne. Pour ces raisons, les méthodes SFA ont été progressivement remplacées par des techniques en flux non segmenté, comme l'analyse par injection en flux (FIA).

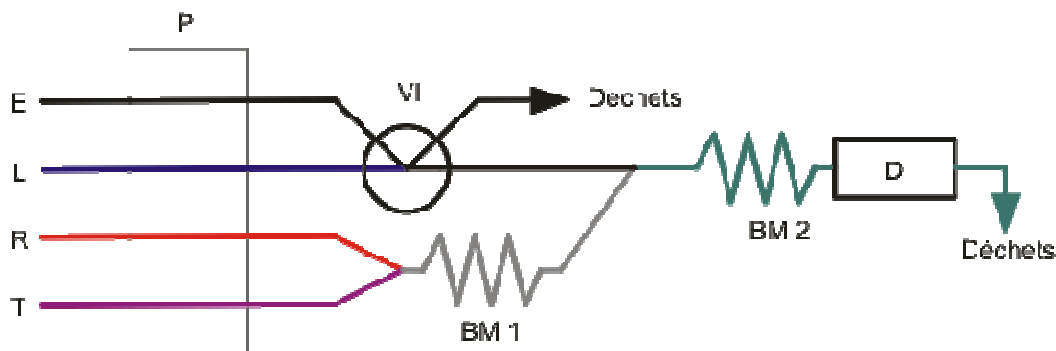


**Figure 20 : Exemple d'analyse en flux segmenté (SFA) (d'après Cerdà et Cerdà, 2009)**

A ce jour, la technique la plus utilisée est la FIA. Cette technique développée dans les années 70 par J. Ruzicka et E. Hansen (1975) est une version non segmentée de la SFA où le problème de bornage des zones réactionnelles est solutionné par une réduction du diamètre des tubulures et par l'utilisation d'une valve d'injection (Figure 21).

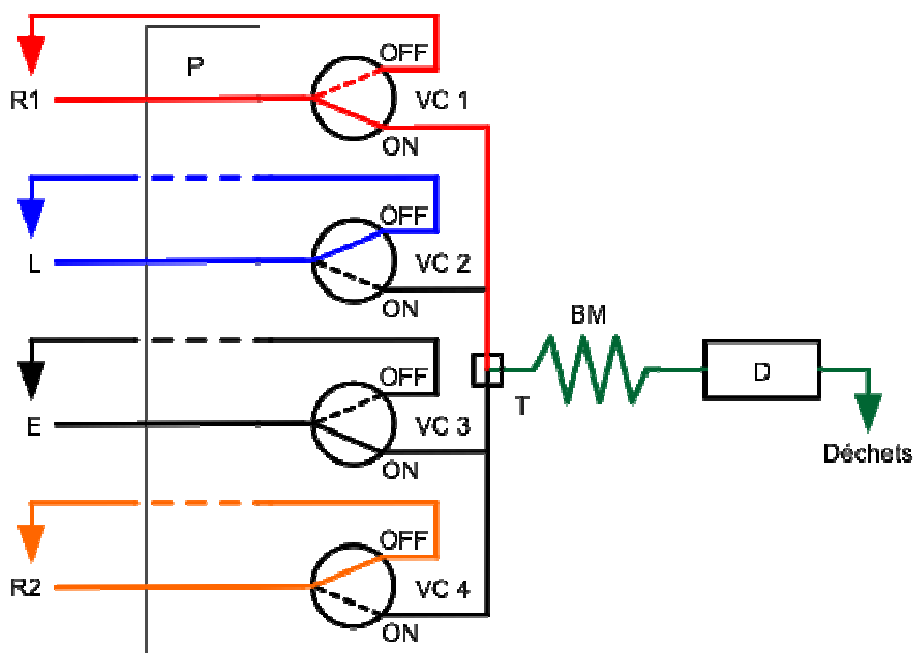
Les tuyaux utilisés sont généralement en polytétrafluoroéthylène (PTFE) d'un diamètre inférieur à 1 mm sauf au niveau de la pompe péristaltique. Cela permet de réduire la consommation en réactif et de s'affranchir de l'étape de nettoyage, augmentant ainsi la fréquence d'analyse.





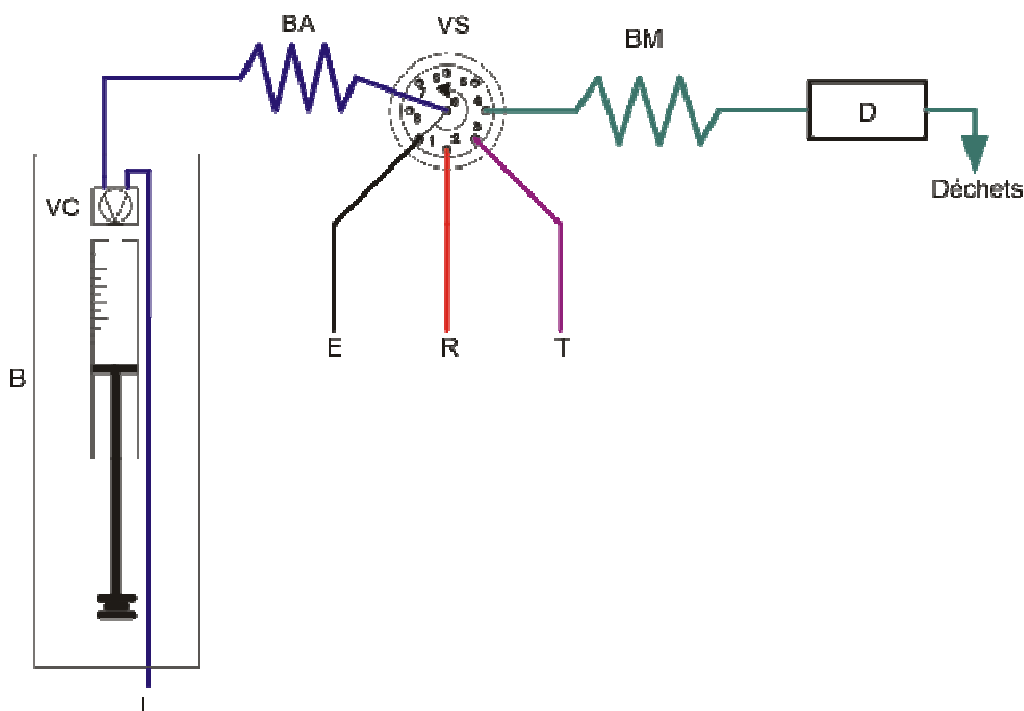
**Figure 21 : Exemple d'analyse avec injection en flux (FIA), avec P la pompe péristaltique, E l'échantillon, L le liquide vecteur, R un réactif, T un tampon, BM 1 et BM 2 des boucles de mélange, VI la valve d'injection et D le détecteur (d'après Vanloot, 2006).**

Compte tenu de la simplicité de la méthode, de sa répétabilité et du faible coût du matériel employé, l'utilisation de la FIA s'est largement répandue, permettant ainsi l'automatisation de l'analyse de différents composés organiques et inorganiques. Cependant, cette méthode, à la fois simple et rapide, a besoin de grandes quantités de réactifs, puisque ces derniers servent de fluide vecteur ; de plus, cette procédure est également peu modulable. Ces problèmes ont en partie été résolus avec le développement de l'analyse par flux multi commutée (MCFA). En effet, cette technique est basée sur l'utilisation d'une pompe péristaltique et des vannes de commutation au sein d'un système d'analyse en flux continu comme le montre la figure 22. Ceci permet de réduire fortement la consommation en réactif puisque, si la vanne est fermée (OFF), le réactif retourne dans son réservoir. Cependant, la méthode comporte un inconvénient majeur, l'utilisation de pompe péristaltique, ce qui induit une maintenance importante du fait de la détérioration des tuyaux par l'écrasement des galets.



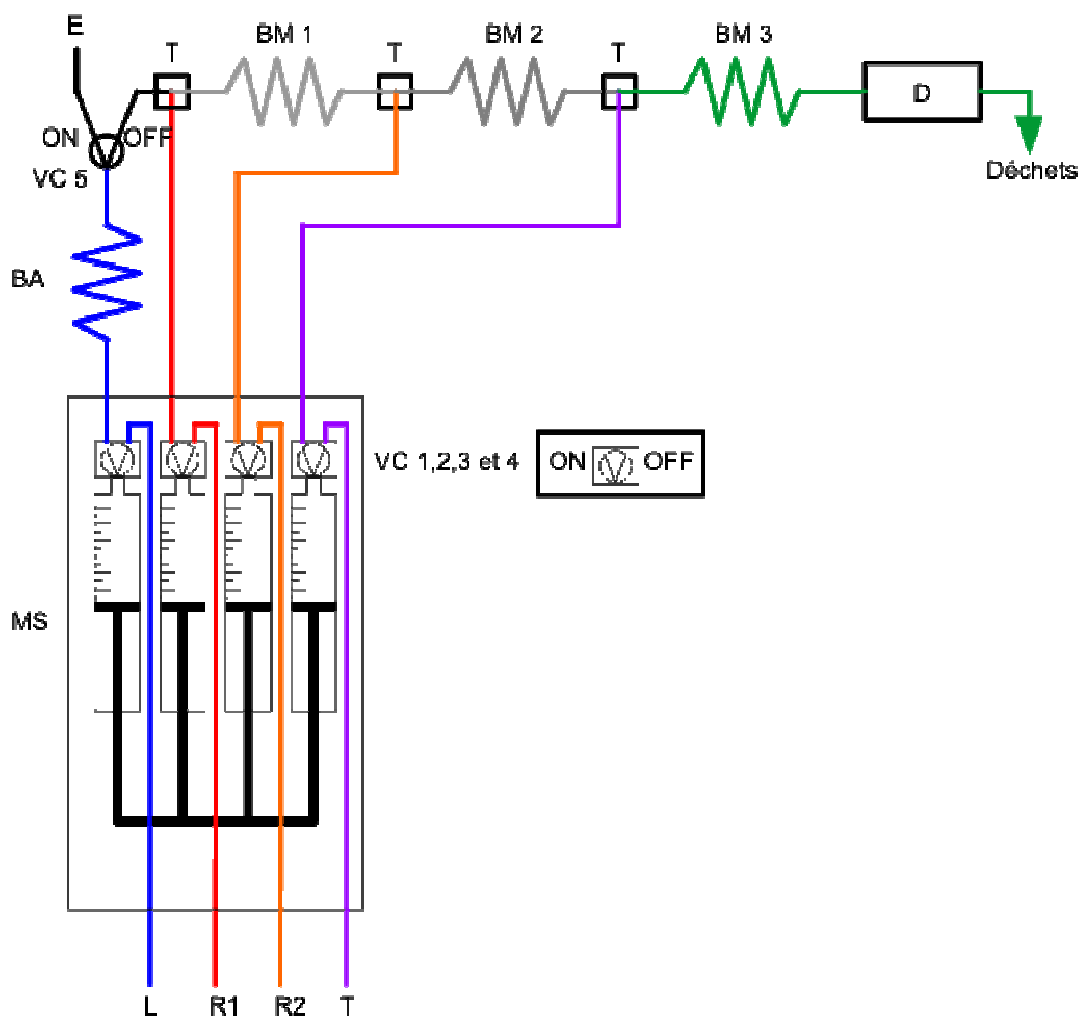
**Figure 22:** Exemple d'analyse en flux multi-commutation (MCFA), avec P la pompe péristaltique, VC 1, 2, 3, 4 les valves de commutations, E l'échantillon, L le liquide vecteur, R1 et R2 deux réactifs, BM une boucle de mélange, T un point de confluence et D le détecteur. (d'après Vanloot, 2006).

Une autre technique basée sur l'injection séquentielle des réactifs et des échantillons a été proposée en 1990 par J. Ruzicka et G.D. Marshall. Cette technique appelée SIA, ou analyse par injection séquentielle est basée sur l'association d'un système de mise en flux bidirectionnel (pompe, burette automatique) et d'une valve de sélection (Figure 23). L'utilisation de burettes automatiques donne une plus grande modularité, permettant, d'une part, d'augmenter le nombre de réactifs utilisés, mais aussi de réaliser une grande combinaison de mélanges entre ces réactifs. Dans cette technique, les mélanges réactionnels ne sont plus réalisés en flux, mais ils sont faits à l'intérieur d'une boucle de mélange d'un volume de quelques dizaines de microlitres. En revanche, la principale contrainte vient de la nécessité de recharger la seringue en liquide lorsque celle-ci est vide, ce qui impose un arrêt du flux et entraîne une augmentation du temps d'analyse.



**Figure 23: Exemple d'analyse par injection séquentielle (SIA), avec B la burette et sa valve solénoïde de commutation VC en tête de seringue, E l'échantillon, L le liquide vecteur, R un réactif, T un tampon, BA une boucle d'attente, BM une boucle de mélange, VS la valve de sélection et D le détecteur (d'après Vanloot, 2006).**

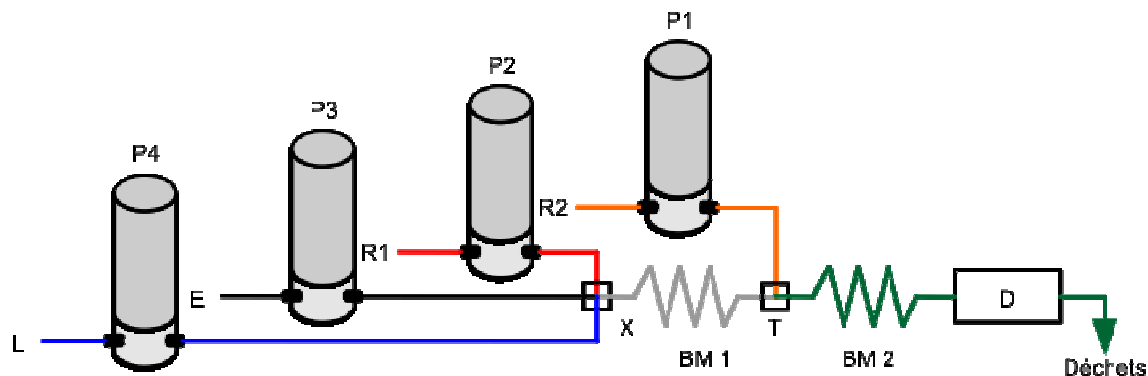
L'analyse en flux multiseringue (MSFIA) fut proposée par Cerda *et al.* en 1999. Cette technique est basée également sur une technique d'injection séquentielle. Celle-ci permet d'augmenter la vitesse des analyses, puisqu'elle constitue un compromis idéal entre la souplesse d'utilisation de la SIA et la rapidité d'analyse de la FIA (Cerdà *et al.*, 1999). Le principe du système MSFIA réside dans l'utilisation d'une burette automatique multiseringue composée de quatre seringues, identiques à celles utilisées en SIA (Figure 24). La burette automatique multiseringue est composée de quatre seringues avec des valves solénoïdes de commutation qui permettent la mise en flux bidirectionnel et d'un moteur pas à pas qui bouge les quatre pistons des seringues simultanément. Lorsque les quatre pistons montent conjointement, seules les seringues dont les valves sont en position ON injectent leur liquide dans le système en flux. Les autres seringues, quant à elles, renvoient leur liquide dans leurs réservoirs respectifs. Ces burettes servent aussi bien pour l'injection des réactifs et de l'échantillon dans la boucle de mélange, que pour l'entraînement des différents fluides pendant l'analyse.



**Figure 24:** Exemple d'analyse en flux multiseringue (MSFIA), avec MS la burette multi seringue et ses valves solénoïde de commutations VC 1, 2, 3, 4 en tête des seringues, E l'échantillon, L le liquide vecteur, R1 et R2 deux réactifs, T un tampon, BA une boucle d'attente, BM 1, 2, 3 des boucles de mélange, VC 5 une valve de commutation, T des point de confluence et D le détecteur (d'après Cerdà *et al.*, 1999).

Récemment, une nouvelle procédure basée sur l'utilisation de micro-pompes (MPFS) a été développée par Lapa *et al.* (2002). Cette technique utilise plusieurs micro-pompes à solénoïde qui jouent le rôle de valve de commutation et mettent en flux les différents liquides dans le système (Figure 25). L'utilisation de ces micro-pompes permet de faire des montages simples, versatiles et faciles à manipuler. Le pilotage des systèmes multi-pompes permet de contrôler le volume dispensé et le débit de chaque pompe individuellement et ainsi de réaliser différentes procédures analytiques avec un même montage. Elles permettent d'injecter l'échantillon et les réactifs dans le flux selon différentes modalités, de manière séquentielle ou simultanée ce qui permet une faible

consommation en réactif, étant donné que chaque pompe dispense sa solution individuellement (Lima *et al.*, 2004; Goullet *et al.*, 2006).



**Figure 25: Exemple d'analyse en flux multi-pompes (MPFS), avec P 1, 2, 3 et 4 les micro-pompes, E l'échantillon, L le liquide vecteur, R1 et R2 deux réactifs, BM 1, 2 des boucles de mélange, T un point de confluence trois voies, X un point de confluence quatre voies et D le détecteur (d'après Cerdà et Cerdà, 2009).**

Cette nouvelle technique a été couplée à différents techniques de détections photométriques tels que la chimiluminescence (Pires *et al.*, 2005; Pires *et al.*, 2006; Morais *et al.*, 2005), la spectrophotométrie UV-Visible (Carneiro *et al.*, 2005; Dias *et al.*, 2003; Pons *et al.*, 2006; Lima *et al.*, 2003; Rebeiro *et al.*, 2005; Carneiro *et al.*, 2002; Lopes *et al.*, 2006), la spectrométrie d'absorption atomique (Lopes *et al.*, 2006). Elle a été également intégrée à des unités d'extraction en phase solide sur résine (Lopes *et al.*, 2006) et membrane (Pons *et al.*, 2005; Pons *et al.*, 2006).

Un autre avantage de la technique MPFS est sa versatilité, puisqu'elle ne requiert pas de boucle d'injection pour introduire l'échantillon, ni de temps d'attente pour recharger les seringues. De plus, elle peut être couplée à des systèmes d'analyse en flux multiseringue (Fajardo *et al.*, 2007), ce qui en fait une alternative intéressante d'automatisation en flux, car la combinaison des deux techniques permet d'avoir de nombreuses qualités telles que simplicité, précision, rapidité, versatilité, faible consommation en réactif et faible coût.

## II.7. Matériels et Méthodes

### II.7.1. Matériels

#### II.7.1.1. Matériel pour les expériences en microplaques.

##### *II.7.1.1.1. Microplaques*

Nous avons employé des microplaques de 96 puits en polystyrène de différentes qualités. Pour les dosages où la réaction forme des produits fluorescents, nous avons utilisé des plaques en polystyrène noir de la marque Microfluor® (Thermo Scientific, USA), qui offrent un très faible bruit de fond en fluorescence. Les puits sont de forme cylindrique à fonds plats (fond F). Pour les mesures d'absorbance, nous avons principalement utilisé des plaques en polystyrène transparent de la marque Greiner (Roskilde, Danemark) avec des puits à fonds plats (fond F) et un volume de travail de 25 – 340 µL.

##### *II.7.1.1.2. Instrument de mesure de fluorescence pour microplaques*

Nous avons utilisé un lecteur microplaques Infinite® M200 commercialisé par TECAN. Ce lecteur fonctionne avec une lampe à xénon de type « flash » fournissant des impulsions de lumière de forte intensité à intervalles de temps régulier. Il possède un système optique additionnel permettant une lecture par le dessous du puits. La mesure peut être optimisée en réglant le gain, le nombre de flashes, le nombre de lectures par puits et la hauteur de focalisation dans le puits. Le logiciel de pilotage du lecteur microplaque est « i Control ». Les données générées par ce logiciel sont exportées et traitées par Microsoft Excel®.

#### II.7.1.2. Matériel pour les expériences d'analyse en flux.

##### *II.7.1.2.1. Système d'analyse en flux*

Parmi les différentes techniques d'automatisation en flux, nous avons choisi la technique combinée MSFIA-MPFS pour sa robustesse et sa versatilité.

Les modules multiseringues ont été fournis par Crison (Espagne). Les seringues sont en verre (Hamilton) de volume variable (1 ; 2,5 ou 5 ml). Chaque seringue est reliée à une valve de commutation à trois voies, permettant d'aspirer et dispenser les solutions à travers deux lignes de flux. La première relie la seringue au réservoir de solution, et la seconde relie la seringue au système en flux. L'ensemble seringue et valve est constituée de matériel chimiquement inerte (PTFE et verre).

↳ Les tubulures étaient en polytétrafluoroéthylène (PTFE) d'un diamètre interne de 0,8 mm et externe de 1,6 mm, munies de raccords haute pression de chez Omnifit.

↳ Un réacteur de mélange, une cellule d'extraction et un raccord en T réalisés tous les trois en polyméthacrylate de méthyle ont été utilisés (Sciware S.L., Espagne).

↳ Deux boucles d'attente ont été réalisées avec des tuyaux en PTFE d'un diamètre interne de 1,3 mm et externe de 1,9 mm, munis de raccords avec filetage 1/4 " 28 filets.

↳ La partie MPFS du système a été réalisée à l'aide de micropompes (Bio-Chem Valve Inc), chacune d'un volume d'éjection systolique de 20µl. Les micropompes solénoïdes sont contrôlées par ordinateur à l'aide d'un système MCFIA/MPFS de chez Sciware, qui dispose de huit canaux numériques de sortie.

↳ Un ordinateur de contrôle, équipé du logiciel Autoanalysis 5.0 (Sciware S.L., Espagne) connecté par une interface RS-232, permet le pilotage du système.

#### *II.7.1.2.2. Instrument de mesure de fluorescence pour l'analyse en flux*

L'acquisition des signaux de fluorescence a été réalisée avec un spectrofluorimètre Perkin Elmer LS55 (Boston, USA) équipé d'une cellule de flux continu en quartz, avec un trajet optique de 1,5 mm et d'un volume interne de 25µL, avec une vitesse de balayage de 300 nm / min et une largeur de fente de 5 nm pour les longueurs d'onde d'excitation et d'émission. Le système est équipé du logiciel FL WinLab (version 4.00.02).

## II.7.2. Réactifs

Les références des produits utilisés pour la réalisation des réactifs de dérivation pour la détection des groupements fonctionnels étudiés sont répertoriées dans le tableau suivant :

**Tableau 8 : Références des produits utilisés pour la constitution des réactifs**

Réactifs	Formule brute	Pureté	Fournisseur	Abréviations
O-phthalaldéhyde	$C_8H_6O_2$	$\geq 98\%$	Aldrich	OPA
Borate de sodium	$Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$	$\geq 99\%$	Fluka	
Acide éthylène diamine tetra-acétique	$C_{10}H_{16}N_2O_8$	-	Fluka	EDTA
Tributylphosphine	$P(C_4H_9)_3$	$\geq 95\%$	Alfa Aesar	TBP
Aminoéthanol	$C_2H_7NO$	$\geq 98\%$	Aldrich	AE
N-acétylcystéine	$C_5H_9NO_3S$	$\geq 99\%$	Aldrich	NAC
N-(3-diméthylaminopropyl)-N'- ethylcarbodiimide).	$C_8H_{17}N_3 \cdot HCl$	$\geq 98\%$	Alfa Aesar	EDC
N-Hydroxybenzotriazole	$C_6H_5N_3O$	$\geq 98\%$	Aldrich	HOBT
N-(1-naphtyl) éthylène diamine	$C_{12}H_{14}N_2 \cdot 2HCl$	$\geq 99\%$	Aldrich	EDAN
Phosphate de sodium	$Na_3PO_4$	$\geq 99\%$	Fluka	
Acide Chlorhydrique	HCl	30% Suprapur	Merck	HCl
Hydroxyde de sodium	NaOH	$\geq 98\%$	Acros Organics	NaOH
Cystéine	$C_3H_7NO_2S$	$\geq 99\%$	Aldrich	Cys
Cystine	$[SCH_2CH(NH_2)CO_2H]_2$	$\geq 99\%$	Alfa Aesar	CSSC
Glycine	$NH_2CH_2COOH$	$\geq 99\%$	Fluka	Gly
Acide Acétique	$CH_3CO_2H$	$\geq 99\%$	Aldrich	
Méthyl <i>tert</i> -butyl éther	$C_5H_{12}O$	$\geq 97\%$	Aldrich	MTBE
N,N-diméthylformamide	$HCO-N(CH_3)_2$	-	Alfa Aesar	DMF
Méthanol	$CH_3OH$	$\geq 99\%$	Aldrich	MeOH



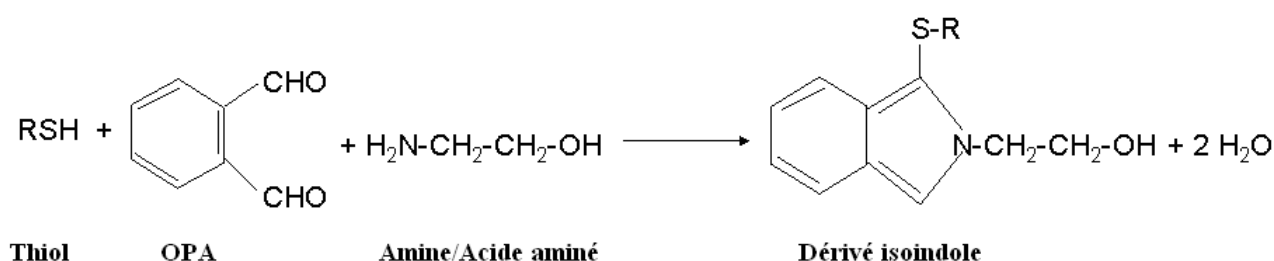
Le pH des solutions est ajusté si nécessaire par ajout d'acide chlorhydrique (HCl) et d'hydroxyde de sodium (NaOH) à 0,1 ou 1 mol.L<sup>-1</sup>. Les modalités de préparation des solutions réactionnelles seront présentées plus en détail dans les procédures de dérivation de chaque groupement fonctionnel.

### II.7.3. Méthodes et procédures

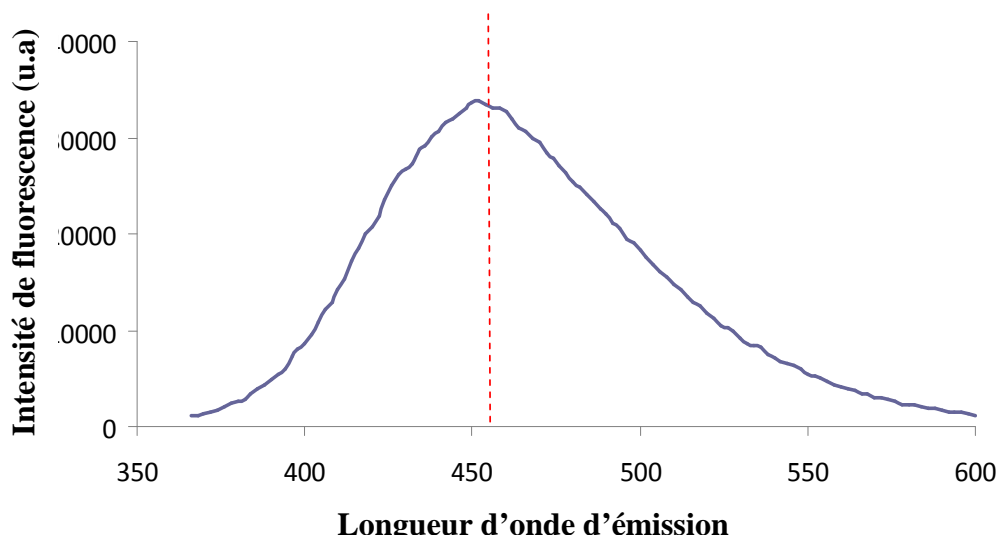
#### II.7.3.1. Amines primaires et acides aminés

##### II.7.3.1.1. Méthode

La méthode proposée est basée sur la réaction de dérivation du groupement amine (NH<sub>2</sub>) avec l'o-phthaldialdéhyde (OPA), en présence d'un thiol (N-acétyl-cystéine (NAC)) en milieu alcalin, permettant de former un dérivé fluorescent (isoindole) (figure 26), quantifiable à  $\lambda_{\text{exc}} = 335\text{nm}$  et  $\lambda_{\text{em}} = 455\text{nm}$  (figure 27). Cette méthode permet d'analyser des composés tels que les acides aminés (glycine, valine, tyrosine...), des amines primaires (aminoéthanol, éthylamine, butylamine...) et des amines biogènes (spermidine, putriscine ...) et d'exprimer les résultats en équivalent-glycine. Cette méthode permet aussi la détection de l'ammonium, raison pour laquelle la procédure comprend deux parties, la première permet la détermination des amines primaires et acides aminés, et la deuxième partie qui permet la quantification de l'ammonium.



**Figure 26: Réaction de dérivation des amines avec l'OPA en présence d'un thiol**



**Figure 27 : Réponse spectrale du dérivé fluorescent à  $\lambda_{em}= 455nm$  ( $\lambda_{exc}= 335nm$ ).**

#### II.7.3.1.2. Procédure

La procédure de détermination des composées aminés et de l'ammonium est effectuée à l'aide d'une unique solution réactionnelle (OPA-NAC). Nous avons préparé une solution mixte borate (50mM)-méthanol (70/30 %) d'OPA-NAC équimolaire (3 mmol.L<sup>-1</sup>) à pH 10,8. Ce mélange est préparé préférentiellement 4 heures à l'avance et stocké à l'abri de la lumière, afin de réduire l'auto fluorescence de la solution. Une fois la solution prête, 100  $\mu$ l d'échantillon (filtré et dilué si nécessaire) sont additionnés au puits, puis 50  $\mu$ l du mélange OPA-NAC sont ajoutés à l'échantillon, une période d'incubation avec agitation pendant 5 minutes est nécessaire afin de bien mélanger. Au bout de 6 minutes l'intensité de fluorescence est mesurée, permettant de déterminer la concentration d'ammonium de l'échantillon.

La procédure globale pour la détection des amines sera constituée de deux étapes (Figure 28). Au cours de la première étape, la concentration de l'ion ammonium sera calculée par mesure de l'intensité de fluorescence à  $\lambda_{em}= 485nm$  ( $\lambda_{ex}= 415$ ). Puis, au cours de la deuxième étape, les concentrations en amines et ammonium présents dans l'échantillon seront quantifiées à  $\lambda_{em}= 455nm$  ( $\lambda_{ex}= 335$  nm). Afin de déterminer la concentration réelle des amines dans l'échantillon, nous utiliserons l'équation suivante, qui a été adaptée de Jones *et al.* (2002) :

$$[NH_2] \mu M = \frac{O_0 - B_0 - R_0 - A_0}{(S_0 - R_0) / G_0}$$

$$A_0 = \frac{AC_0}{AS_0} x (AR_0 - R_0)$$

$O_0$  = Intensité de fluorescence de l'OPA-NAC avec l'échantillon

$B_0$  = Intensité de fluorescence de l'échantillon sans OPA-NAC

$R_0$  = Intensité de fluorescence de l'OPA-NAC à  $\lambda_{em} = 455nm$  ( $\lambda_{ex} = 335$ )

$G_0$  = Concentration de l'amine standard (Glycine  $10\mu M$ )

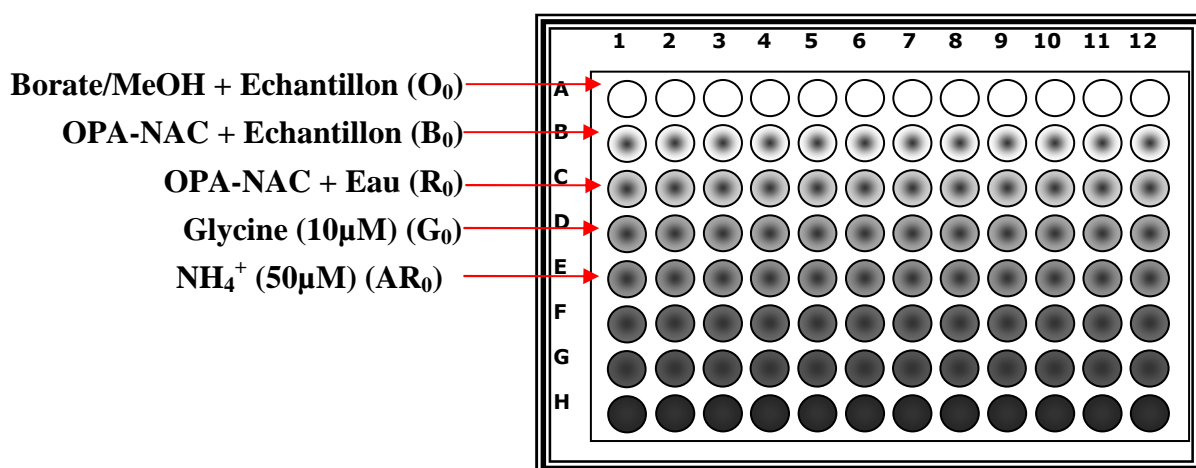
$S_0$  = Intensité de fluorescence de l'amine standard ( $G_0$ ) à  $\lambda_{em} = 455nm$  ( $\lambda_{ex} = 335$ )

$A_0$  = Quantité de  $NH_4^+$  en intensité de fluorescence avec OPANAC à  $\lambda_{em} = 455nm$

$AC_0$  = Concentration de  $NH_4^+$  calculé avec l'OPANAC à  $\lambda_{em} = 485nm$  ( $\lambda_{ex} = 415$ )

$AS_0$  = Concentration de l'ammonium standard ( $NH_4^+$   $50\mu M$ )

$AR_0$  = Intensité de fluorescence du  $NH_4^+$  standard ( $AS_0$ ) à  $\lambda_{em} = 455nm$  ( $\lambda_{ex} = 335$ )



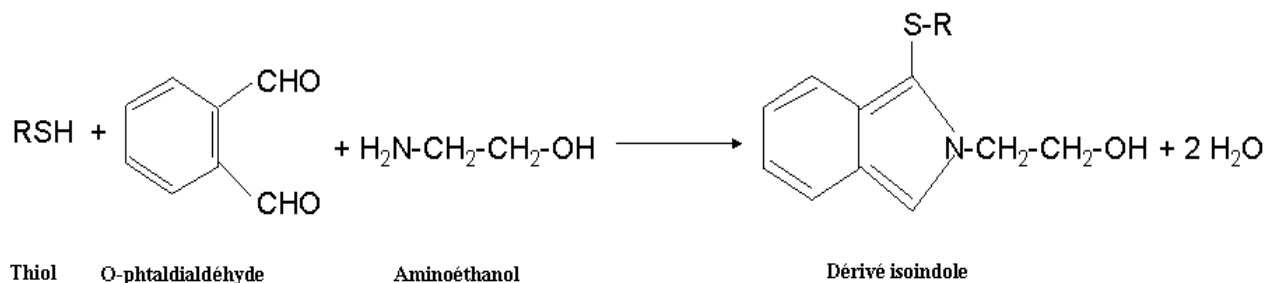
**Figure 28: Procédure en microplaque pour la détection d'amines et d'ammonium**

### II.7.3.2. Thiols

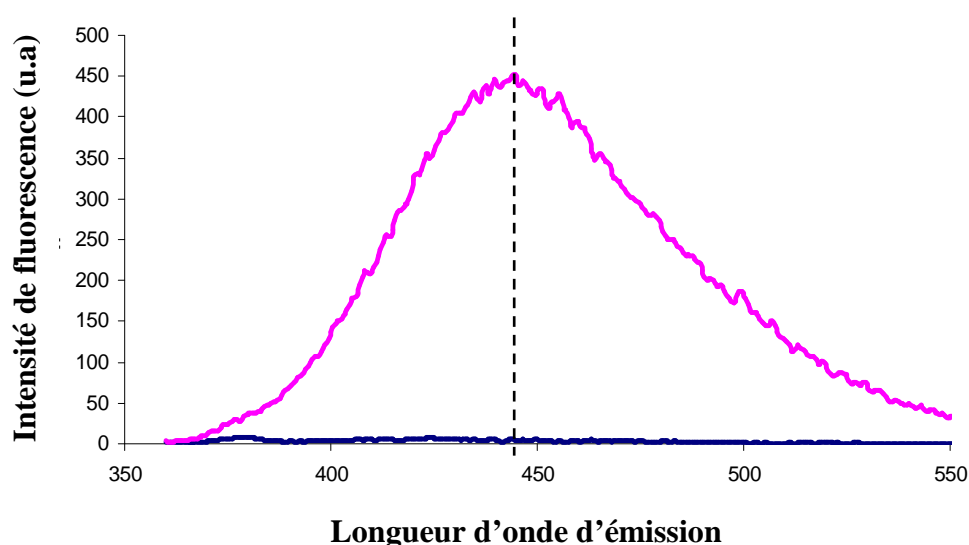
#### II.7.3.2.1. Méthode

La méthode proposée est basée sur la réaction de dérivation du groupement thiol (RSH) avec l'O-phthaldialdéhyde (OPA), en présence d'une amine (aminoéthanol), en milieu basique, permettant de former un dérivé fluorescent (isoindole) (Figure 29), quantifiable et spécifique à  $\lambda_{em} = 445nm$ ,  $\lambda_{ex} =$

335nm (Figure 30). Cette méthode permet d'analyser des composés tels que le glutathion, la cystéine, le 2-mercaptoéthanol, l'acide 3-mercaptopropionique, la N-acétyl-cystéine, la coenzyme A et d'exprimer les résultats en équivalent-cystéine. La méthode a également été étendue aux composés à ponts disulfures (thiols oxydés).



**Figure 29: Réaction de dérivation des thiols avec l'OPA en présence d'une amine primaire**

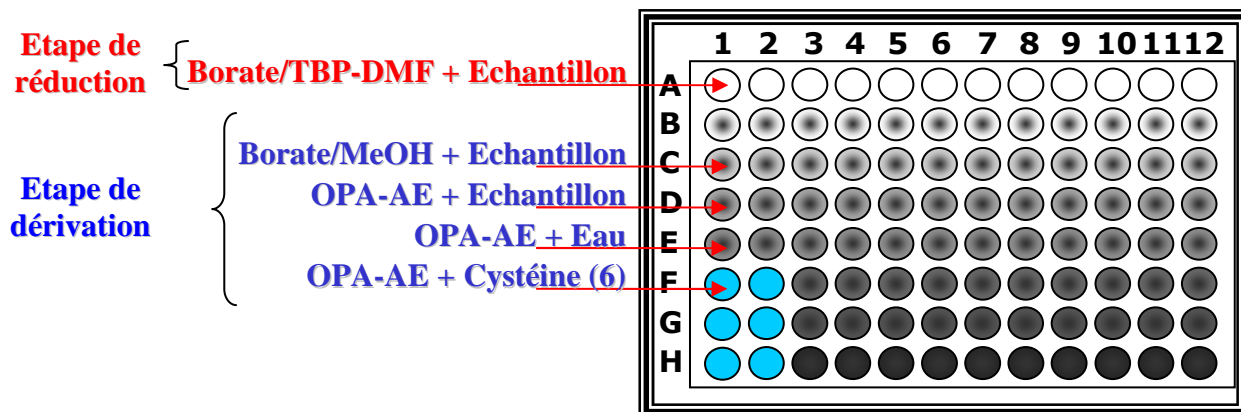


**Figure 30 : Réponse spectrale du dérivé fluorescent à  $\lambda_{em}=445\text{nm}$  ( $\lambda_{exc}=335\text{nm}$ ).**

Du fait des deux formes de thiols (réduites et oxydées) présentes dans l'environnement, la procédure de la méthode proposée pour la détection des thiols est réalisée en deux parties : la première partie va permettre de détecter les thiols réduits et la deuxième partie va permettre de détecter les thiols totaux, la différence entre thiols réduits et thiols totaux nous donne la concentration en thiols oxydés (ponts disulfures + thiols complexés par les métaux) dans l'échantillon :  $[\text{RSH}_{\text{oxydés}}] = [\text{RSH}_{\text{totaux}}] - [\text{RSH}_{\text{réduits}}]$

## II.7.3.2.2. Procédure

La procédure globale réunissant les conditions opératoires optimales pour la détermination de thiols réduits et thiols totaux en microplaque est présentée dans la figure 31.



**Figure 31 : Procédure en microplaque pour la détection de thiols totaux**

La procédure utilisée pour la détection des thiols totaux ( $[\text{RSH}_{\text{totaux}}] = [\text{RSH}_{\text{oxydés}}] + [\text{RSH}_{\text{réduits}}]$ ) est développée de la façon suivante :

## II.7.3.2.3. Etape de réduction

Dans cette étape, la solution réductrice de TBP ( $200 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) préparée dans le DMF est ajoutée après la solution tampon de borate ( $100 \text{ mmol.L}^{-1}$ ,  $\text{pH}=8,2$ ) à l'échantillon. La solution tampon va contenir aussi l'agent chélateur (EDTA) qui va empêcher l'oxydation des thiols réduits et va permettre de complexer les métaux pendant la réduction avec le TBP.

La réduction est faite directement dans la microplaque. Les volumes utilisés pour cette étape sont :

200µl échantillon (filtré et dilué si se nécessaire)

10µl Solution borate (100mM, pH 8,2) / EDTA [ $0.1 \text{ mol.L}^{-1}$ ]

10µl Solution Tributylphosphine dans le DMF [ $200 \text{ mmol.L}^{-1}$ ]

Après 10 minutes d'agitation à une température fixée à  $28^{\circ}\text{C}$ , 15µl sont prélevés et ajoutés dans un deuxième puits afin de faire la dérivation avec l'OPA-AE (étape de dérivation).

## II.7.3.2.4. Etape de dérivation

Dans cette étape les réactifs de dérivation que sont l'o-phthalaldéhyde (OPA) et l'aminoéthanol (AE) sont préparés de la façon suivante :

- Solution AE : 26 mmol.L<sup>-1</sup> avec 10 mmol.L<sup>-1</sup> EDTA dans borate de sodium 50 mmol.L<sup>-1</sup> (pH=9,5)
- Solution OPA : 116 µmol.L<sup>-1</sup> dans du méthanol (43%)

Afin de mesurer l'intensité de fluorescence du produit isoindole formé, on ajoute dans chaque puits des solutions contenant:

15µL Echantillon (pris dans le puits de réduction)

155µL Solution AE

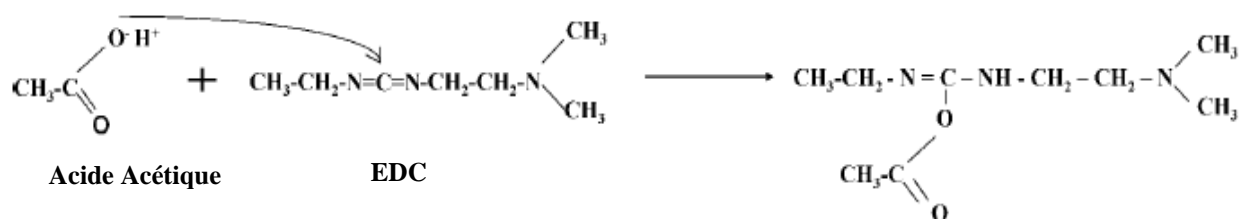
130µL Solution OPA

L'ordre d'ajout des solutions doit strictement être respecté (1. Echantillon, 2.Aminoethanol, 3. OPA). Au bout de 5 minutes d'agitation et d'incubation, l'intensité de fluorescence est mesurée à 445 nm, après excitation à 335 nm.

## II.7.3.3. Acides carboxyliques à chaîne courte

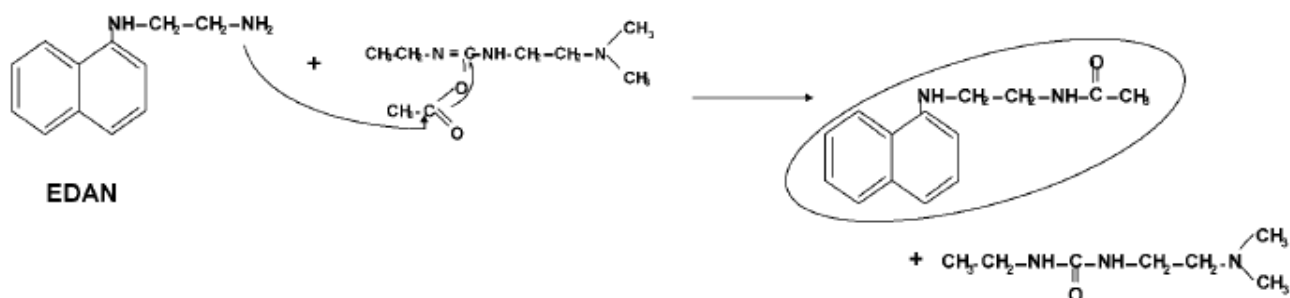
## II.7.3.3.1. Méthode

Le principe proposé pour la détection des composés carboxyliques comporte plusieurs étapes. La première étape permet l'activation du carbone portant le groupement -OH avec une carbodiimide (N-(3-diméthylaminopropyl)-N-éthylcarbodiimide (EDC)) (Figure 32).



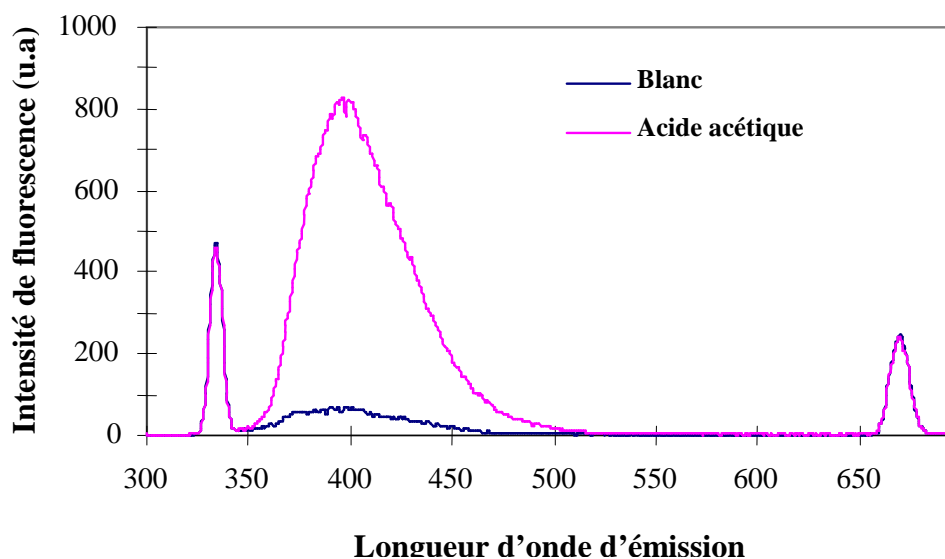
**Figure 32. Activation du carbone portant le groupement -OH de l'acide acétique avec le N'-(3-diméthylaminopropyl)-N-éthylcarbodiimide (EDC)**

Cette réaction donne lieu à la formation d'un produit intermédiaire activé, qui réagit ensuite avec un deuxième réactif d'activation (N-hydroxybenzotriazole, HOBT) et avec une amine fluorescent N-(1-naphtyl) éthylène diamine (EDAN) formant ainsi un produit fluorescent (Figure 33).



**Figure 33 : Dérivation avec EDAN (N-(1-naphtyl) éthylène diamine) de l'acide acétique pré-activé. Le produit résultant de cette réaction est un dérivé amidé fluorescent (encerclé)**

Après cette étape d'amidation, une étape d'extraction liquide-liquide du dérivé formé avec le méthyl *tert*-butyl éther (MTBE) est nécessaire, afin d'éliminer l'excès d'EDAN qui masque la fluorescence du dérivé formé détecté à  $\lambda = 395$  nm ( $\lambda_{\text{exc}} = 335$ nm) (Figure 34).



**Figure 34 : Réponse spectrale du dérivé fluorescent à  $\lambda_{\text{em}} = 395$ nm ( $\lambda_{\text{exc}} = 335$ nm).**

Cette méthode a été appliquée à un grand nombre d'acides carboxyliques détectables dans les échantillons environnementaux aqueux. Les résultats obtenus ont permis d'établir que cette méthode répond uniquement en présence des petits acides carboxyliques (C2-C5) tels qu'acétique, propionique, butyrique et valérique, ce qui rend cette méthode spécifique pour la détection des acides gras volatils (AGV).

# **CHAPITRE III : Résultats et Discussions**



### III.1. Détermination des amines primaires et acides aminés par automatisation en microplaque avec détection par fluorescence

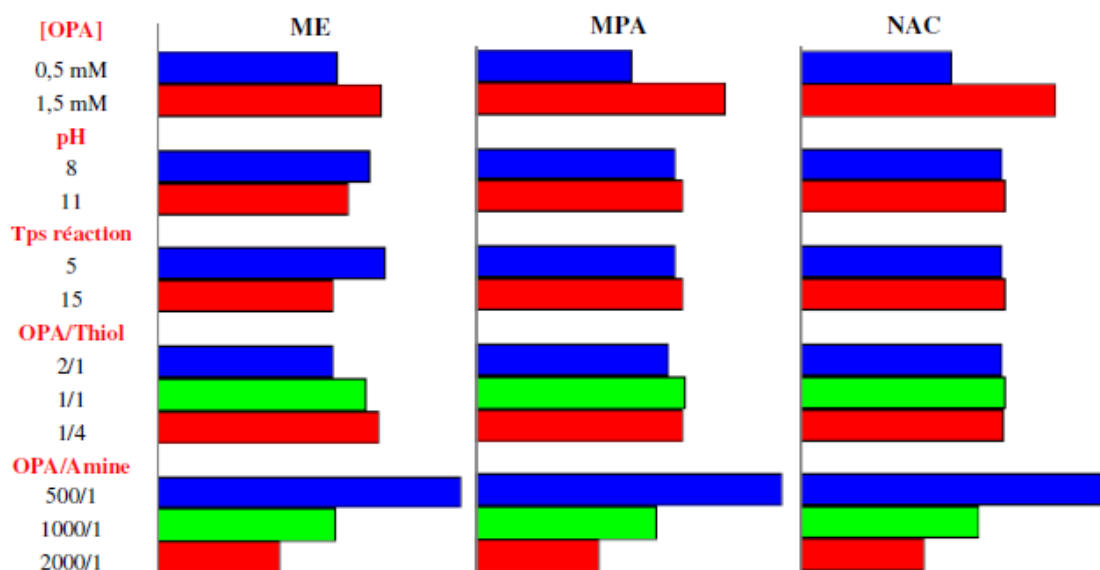
#### III.1.1 Présentation des paramètres influençant la dérivation et la détection des composés aminés

D'après l'étude bibliographique réalisée sur la dérivation des composés aminés avec l'OPA (cf. Chapitre II), différents facteurs peuvent influencer la formation et la stabilité des composés isoindoles fluorescents résultant de la réaction entre les composés aminés et l'OPA en présence d'un thiol. Afin de connaître les facteurs les plus influents pour la dérivation, une étude de criblage a été effectuée avec trois thiols différents (mercaptoéthanol (ME), acide 3-mercaptopropionique (MPA) et N-acétyl cystéine (NAC)) de manière à choisir le thiol le plus approprié pour la dérivation et la détection des amines. Cette étude de criblage comprend 5 facteurs, avec 2 ou 3 niveaux pour chacun d'eux, présentés dans le tableau 9. La glycine a été choisie comme amine de référence du fait de son ubiquité dans l'environnement.

**Tableau 9: Domaine expérimental pour le criblage des facteurs influençant la dérivation des amines avec l'OPA**

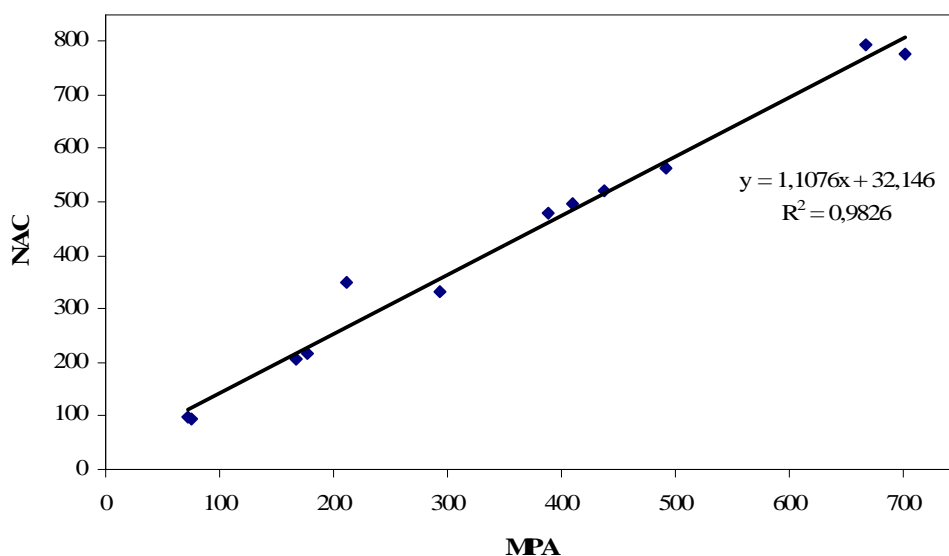
Facteur	Nombre Niveaux	Niveaux
[OPA]	2	0,5 mM 1,5 mM
pH	2	8 11
Tps réaction	2	5 mn 15 mn
OPA/Thiol	3	2/1 1/1 1/4
OPA/Amine	3	500/1 1000/1 2000/1

Les graphes de la figure 35 montrent que l'augmentation de la concentration d'OPA [ $1,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ ] accroît fortement la réponse de la glycine en présence des trois thiols étudiés. D'autre part, on observe que la réponse obtenue avec le mercaptoéthanol (ME) diminue en fonction du temps et est plus dépendante d'un changement de pH, ce qui compromet la stabilité du dérivé formé, et qui permet d'exclure le ME des choix.



**Figure 35 : Résultats du criblage effectué afin d'étudier les facteurs pouvant influencer la formation et la stabilité du dérivé isoindole pour chaque thiol analysé.**

Ces résultats nous permettent d'établir que pour le NAC et le MPA la réponse reste stable et ne varie pas en fonction du temps, ni par changement de pH, ni par le rapport OPA/thiol qui a peu d'influence sur l'intensité de fluorescence. Ceci implique que les conclusions obtenues pour les réponses du MPA seront les mêmes que pour les réponses du NAC. Ceci peut être confirmé par la corrélation de réponses montrées dans la figure 36.



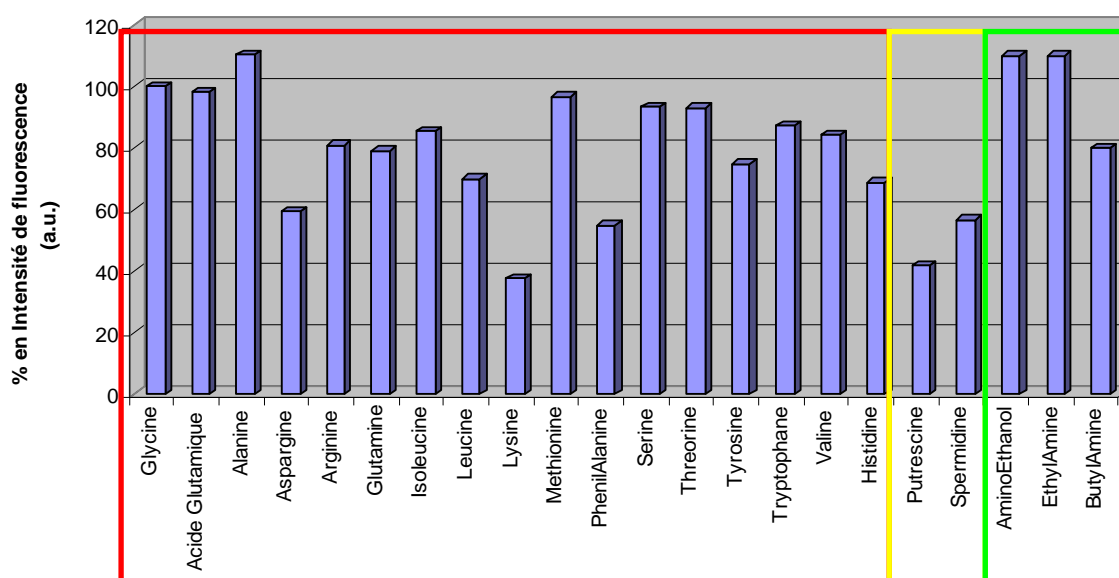
**Figure 36: Corrélation entre les valeurs MPA et NAC obtenus après l'étude de criblage**

Comme les réponses obtenues avec les deux thiols sélectionnés sont similaires, nous avons choisi de travailler avec le thiol le moins toxique et le moins odorant, et pour cela le NAC est le plus approprié des thiols.

Le plan de criblage effectué a permis de constater que le seul facteur influençant la réponse obtenue pour la dérivation de la glycine par le NAC est la concentration d'OPA. Il est donc inutile ici de mettre en place un plan d'expérience pour l'optimisation des conditions opératoires : les réponses maximales pour la dérivation de la glycine en présence de NAC vont être obtenues en travaillant en excès d'OPA ( $<1500 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ), dans une gamme de pH comprise entre 8 et 11, avec un temps de réaction de 5 minutes et un ratio OPA:thiol compris entre 2 :1 et 1:4. Ces différents paramètres vont être mis en œuvre afin de développer la méthode de dosage des amines primaires et acides aminés.

### III.1.2. Etude de sélectivité

Avec les conditions opératoires précédemment obtenues, qui permettent de former un dérivé isoindole présentant un signal de fluorescence élevé et stable, on a effectué une étude de sélectivité avec des acides aminés, amines primaires et biogéniques (Figure 37) les plus souvent rencontrés dans les échantillons environnementaux.



**Figure 37 : Fluorescence des isoindoles formés par la dérivation (OPA-NAC) de différents composés aminés ( — Acides aminés — Amines biogéniques — Amines primaires)**

Les résultats obtenus et présentés sur la figure 34 montrent le pourcentage de l'intensité de fluorescence par rapport à la glycine (%IF = 100) des acides aminés, amines primaires et biogéniques. Ceci permet d'établir qu'une grande diversité d'amines peut être détectée par cette méthode.

### III.2.3. Etude des interférences

Une étude des interférents potentiels pour la procédure analytique développée a été réalisée. A cette fin, nous avons effectué la détermination de la glycine au sein de plusieurs mélanges contenant chacun un élément potentiellement interférent. Ces éléments ont été choisis en tenant compte de leur possible interaction avec l'amine, l'OPA ou le thiol utilisés pour la dérivation.

Les résultats obtenus lors de la dérivation avec les différents mélanges seront comparés à la mesure réalisée sur une solution contenant seulement de la glycine. Pour les différents mélanges réalisés, les conditions expérimentales de dérivation utilisées ont été analogues à celles décrites précédemment. La concentration en glycine utilisée dans tous les mélanges a été fixée à  $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ . Les différents résultats obtenus sont présentés dans le tableau 10.

**Tableau 10 : Effets de différents éléments interférents sur la fluorescence du dérivé isoindole.**  
([OPA] =  $1,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ , [NAC]= $3 \text{ mmol.L}^{-1}$ , pH=9,5)

	Concentrations interférentes [ $\text{mg.L}^{-1}$ ]	% Intensité de Fluorescence
Glycine ( $1 \mu\text{M}$ )	0	100
$\text{Al}^{3+}$	2	91,0
Se (IV)	1	98,2
Fe (III)	5	96,8
Fe (II)	1	83,8
$\text{Cu}^{2+}$	10	99,4
$\text{Mn}^{+}$	10	91,4
$\text{Zn}^{2+}$	10	100,2
$\text{Ni}^{2+}$	0,5	96,6
$\text{Cd}^{2+}$	0,5	98,6
$\text{Mg}^{2+}$	25	99,4
$\text{Ca}^{2+}$	100	103,0
$\text{Na}^{2+}$	100	101,0
$\text{K}^{+}$	100	101,6
$\text{PO}_4^{3-}$	1	99,0

CO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	10	99,0
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	5	95,2
NO <sub>3</sub>	50	100,2
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	250	95,8
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	1	199,6

Les résultats présentés dans le tableau 2 mettent en évidence l'interférence de l'ion ammonium dans la méthode de détection proposée. Ceci implique la nécessité d'éliminer l'ion ammonium afin de quantifier la concentration réelle en amines dans l'échantillon.

#### III.1.4. Caractéristiques opérationnelles de la méthode pour la détection de composés aminés et de l'ammonium.

Du fait de la réactivité de l'ion ammonium avec notre réactif OPA-NAC, nous avons testé différentes méthodes d'élimination des ions ammoniums (résines échangeuses d'ions, membranes...) mais pour chacune de ces méthodes testées, les amines étaient éliminées concomitamment.

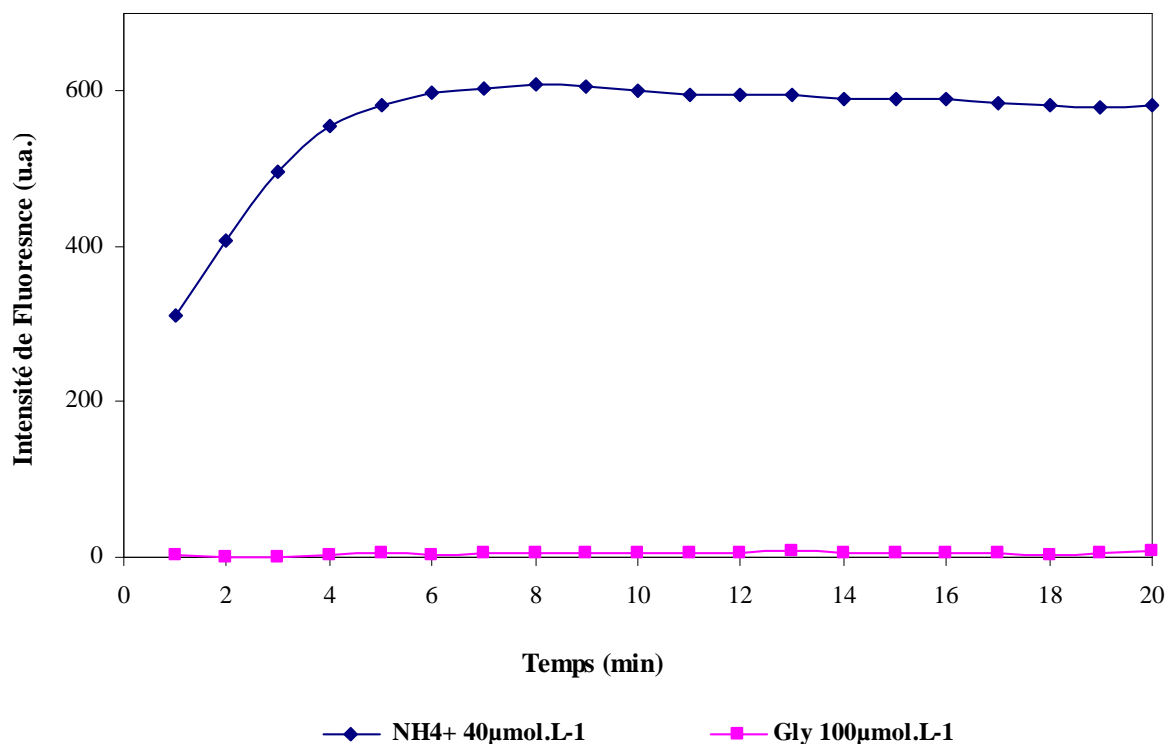
Nous avons donc décidé de quantifier l'ammonium séparément, puis de déduire la concentration en amines par calcul de la différence de réponse obtenue la réponse donnée sur la mesure des amines totales (amines + ammonium quaternaire) et celle obtenue sur la mesure des ions ammonium.

Une étude bibliographique a permis d'identifier différentes méthodes permettant de détecter l'ammonium par fluorescence. Ces méthodes sont basées sur la réaction de dérivation de l'OPA avec des composés soufrés tels que les ions sulfites (Chun-Ting *et al.*, 2005), le thioglycolate (Mana et Spohn, 2000), le 2-mercaptoéthanol (Poulin et Pelletier, 2007), la N-acétyl-cystéine (Meseguer-Lloret *et al.*, 2005).

Des essais ont été effectués pour chacune de ces méthodes, mais c'est la réaction OPA-NAC-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> qui a attiré notre attention ; tout d'abord parce qu'elle ne nécessite pas de temps de réaction longs contrairement à la méthode avec les ions sulfites ou avec le mercaptoéthanol, et d'autre part car le composé isoindole formé est détecté par fluorescence à des longueurs d'onde pour lesquelles les isoindoles formés avec les autres composés aminés n'interfèrent pas.

En effet, le mélange OPA-NAC en présence d'ammonium forme un dérivé isoindole détectable par fluorescence à  $\lambda_{em} = 460$  nm ( $\lambda_{ex} = 335$ nm), qui interfère avec la mesure des amines ( $\lambda_{em} = 455$ nm ;  $\lambda_{ex} = 335$ nm). Cependant, le composé isoindole formé avec NH<sub>4</sub><sup>+</sup> peut aussi être détecté à  $\lambda_{em} = 485$

nm ( $\lambda_{\text{ex}} = 415$ ), la fluorescence du dérivé étant stable après 6 minutes de réaction. Comme on peut l'observer dans la figure 38, à cette longueur d'onde, le dérivé isoindole formé avec la glycine ne fluoresce pas.

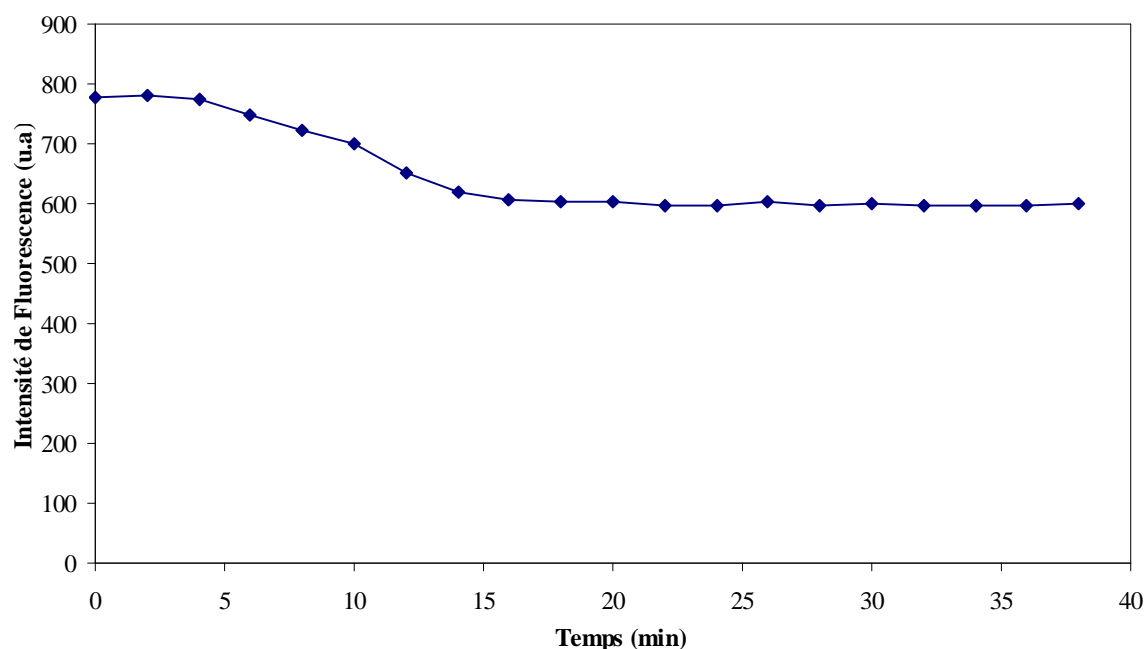


**Figure 38: Cinétique de stabilité du dérivé isoindole en présence de  $\text{NH}_4^+$  et de glycine à  $\lambda_{\text{em}} = 485$  nm ( $\lambda_{\text{ex}} = 415$  nm)**

Grâce à cette propriété de la méthode OPA-NAC, nous pouvons nous servir d'un seul puits de microplaque et ainsi du même échantillon pour détecter les composés aminés ainsi que l'ion ammonium interférent. En effet, comme nous l'avons démontré avec l'étude de criblage, la dérivation OPA-NAC avec des composés aminés présente des gammes de pH, [OPA], ratio OPA/thiol très grandes tout en conservant une bonne stabilité du dérivé et un signal de fluorescence important. L'amplitude de ces gammes permet donc d'utiliser les mêmes paramètres opérationnels pour les composés aminés et l'ion ammonium.

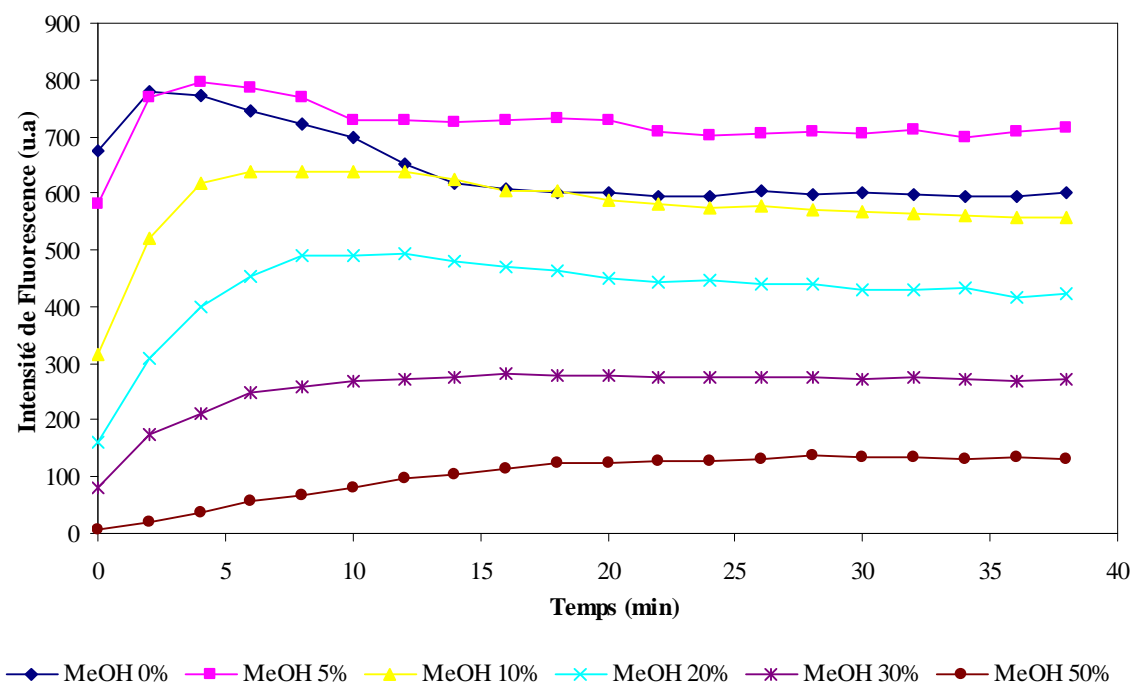
Les conditions optimales pour la dérivation de l'ammonium ont été discutées dans une étude effectuée par Meseguer-Lloret *et al.* (2005). Cette étude a démontré que le pH et le ratio OPA/NAC sont très influents dans la dérivation de l'ammonium. D'après leurs résultats, ils ont proposé des valeurs optimales de pH ainsi que du ratio OPA/NAC respectivement égales à 10,8 et 1:1. Nous

avons réalisé des tests en microplaque d'après ces conditions opératoires afin de quantifier la concentration en ammonium au sein d'un mélange glycine/ $\text{NH}_4^+$ . Les conditions opératoires utilisées ont été:  $[\text{OPA}] = 3 \text{ mmol.L}^{-1}$ ,  $[\text{NAC}] = 3 \text{ mmol.L}^{-1}$ , avec un pH de 10,8. Les premiers résultats ont montré que le signal de fluorescence du dérivé formé avec  $\text{NH}_4^+$  décroît rapidement au bout 3 minutes de réaction (Figure 39).



**Figure 39: Stabilité de fluorescence du dérivé ammonium formé à  $\lambda_{\text{em}} = 485\text{nm}$ .  $[\text{OPA}] = 3 \text{ mmol.L}^{-1}$ ,  $[\text{NAC}] = 3 \text{ mmol.L}^{-1}$ , pH : 10,8**

Afin d'obtenir un isoindole plus stable, nous avons ajouté du méthanol dans le mélange réactionnel. Les résultats obtenus et présentés dans la figure 40 permettent de voir que la stabilité du dérivé augmente avec l'augmentation du pourcentage de méthanol dans le mélange réactionnel, mais que l'intensité de fluorescence diminue. Le signal de fluorescence du dérivé est stable pendant plus de 30 minutes avec un pourcentage de méthanol de 30%.



**Figure 40 : Influence du pourcentage de méthanol dans la stabilité du dérivé-ammonium à  $\lambda_{em}=485nm$ . [OPA] = 3 mmol.L<sup>-1</sup>, [NAC] = 3 mmol.L<sup>-1</sup>, pH : 10,8**

Malgré la perte de sensibilité de la méthode, nous avons décidé de garder ce pourcentage de méthanol qui donne une bonne stabilité du dérivé au bout de 6 minutes. Ainsi les conditions optimales de dérivation des composés aminés et de l'ammonium sont : [OPA] = 3 mmol.L<sup>-1</sup>, [NAC] = 3 mmol.L<sup>-1</sup>, pH = 10,8 en présence de 30% de méthanol.

Il est très important de remarquer que dans les conditions précédentes (donc en présence de méthanol à 30%) et à  $\lambda_{em}=455nm$ , le dérivé formé avec la glycine présente une très bonne stabilité en fonction du temps, ce qui permet de mesurer l'intensité de fluorescence après la première minute de formation du dérivé ; par contre, la linéarité du dérivé formé avec l'ammonium est limitée par la stabilité de l'isoindole formé (Figure 41). En effet, après avoir fait une étude de la linéarité en fonction de la stabilité de l'OPA-NAC-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> à  $\lambda_{em}=455nm$ , nous avons remarqué que pour la formation du dérivé ammonium la linéarité et la sensibilité diminuent rapidement (Figure 42). Par conséquent, nous avons décidé de fixer le temps de mesure de l'intensité de fluorescence de la valeur d'intensité de fluorescence (dérivé formé avec la glycine + dérivé formé avec NH<sub>4</sub><sup>+</sup> à  $\lambda_{em}=455nm$ ) à 3 minutes, afin d'éviter des erreurs dans l'équation de quantification des composés aminés présents dans l'échantillon.



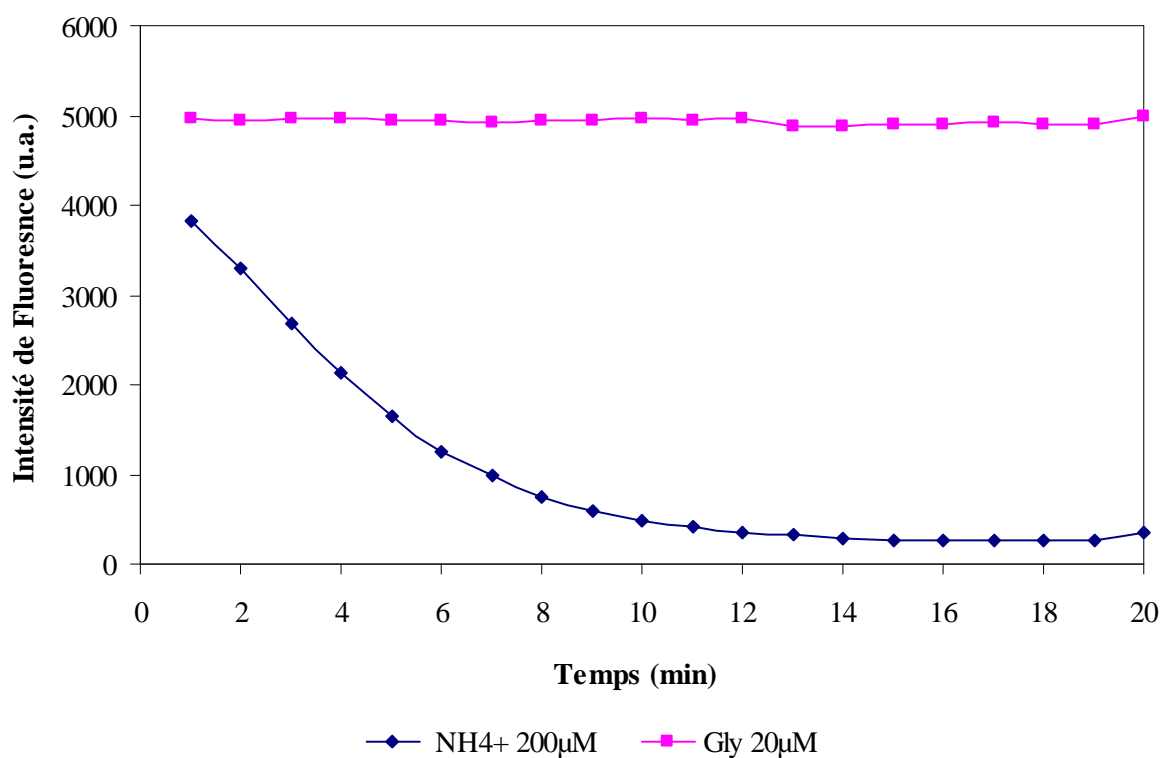


Figure 41: Cinétique de stabilité du dérivé isoindole en présence de  $\text{NH}_4^+$  et glycine à  $\lambda_{\text{em}} = 455 \text{ nm}$  ( $\lambda_{\text{ex}} = 335 \text{ nm}$ )

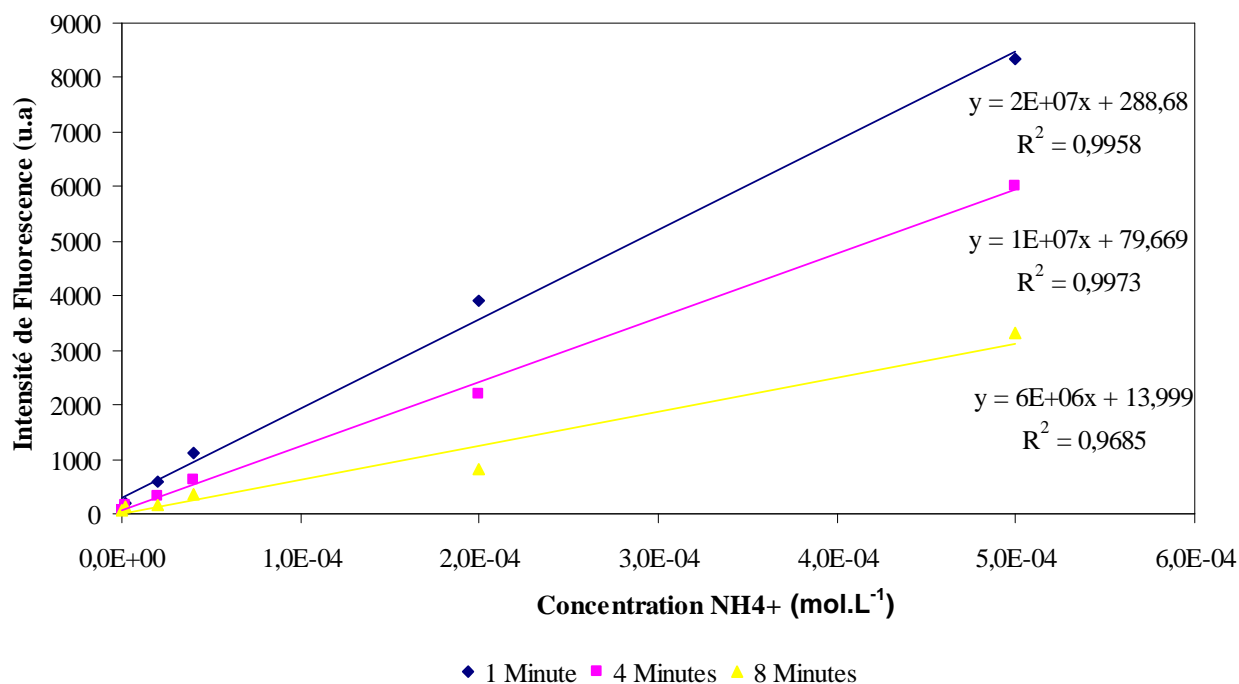
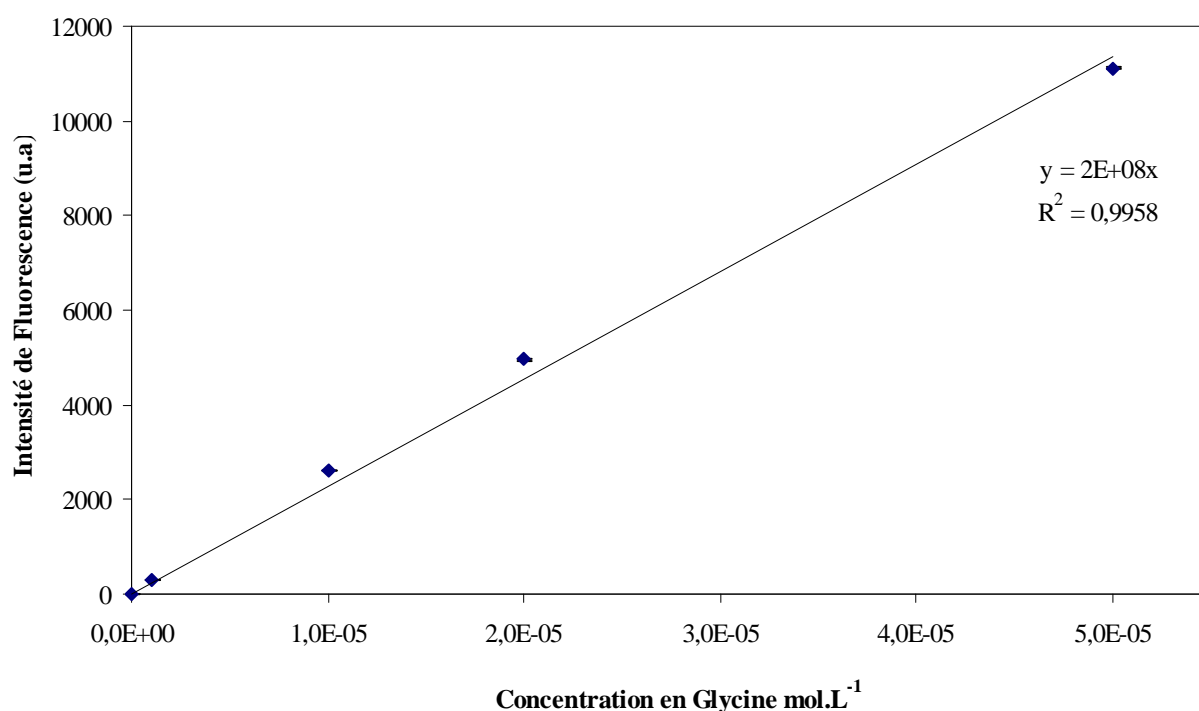


Figure 42: Evolution des droites d'étalonnage du dérivé ammonium à  $\lambda_{\text{em}} = 455 \text{ nm}$  ( $\lambda_{\text{ex}} = 335 \text{ nm}$ ) [ $\text{OPA}$ ] = 3  $\text{mmol.L}^{-1}$ , [ $\text{NAC}$ ] = 3  $\text{mmol.L}^{-1}$ , pH = 10,8

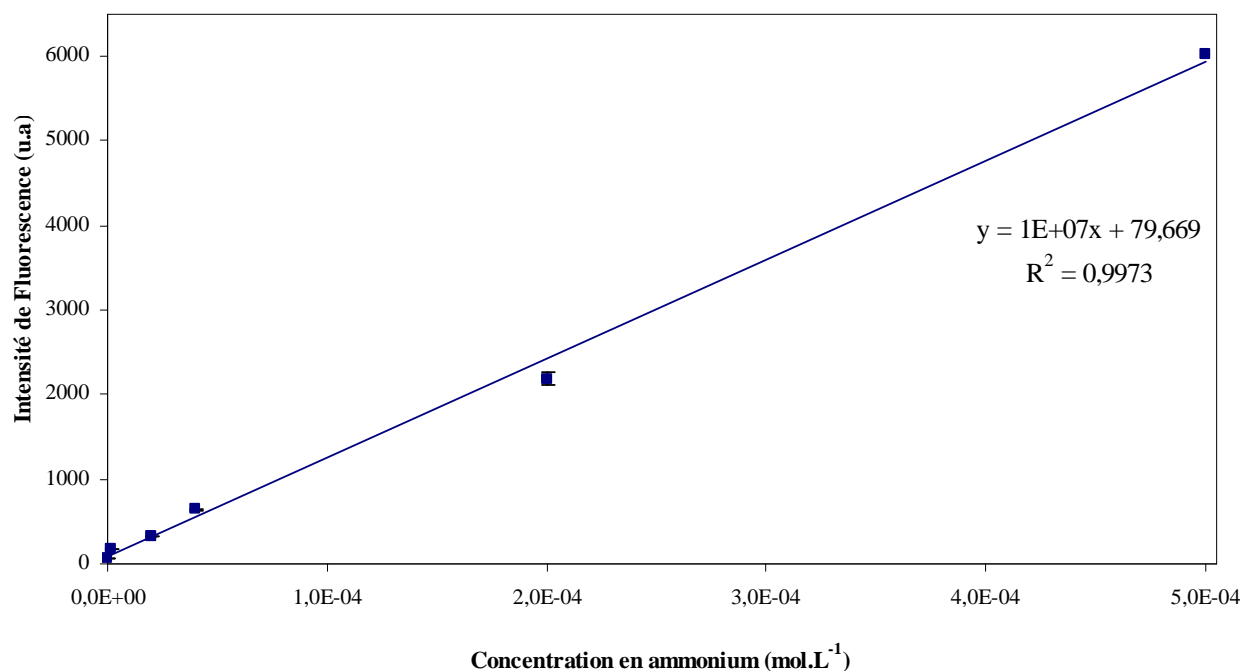
### III.1.5. Caractéristiques analytiques

Cette étude permet de définir le domaine de linéarité ainsi que les limites de détection et de quantification de la méthode pour la détection des composés aminés et de l'ion ammonium.

L'étude à tout d'abord été effectuée à  $\lambda_{em}=455nm$  sur les composés aminés et l'ion ammonium puis dans un deuxième temps sur l'ion ammonium seul à  $\lambda_{em}=485nm$ . La courbe de calibration a été réalisée sur des solutions contenant des concentrations croissantes en glycine (Figure 43) ou en ammonium. On a ainsi obtenu un domaine de linéarité qui s'étend jusqu'à  $50 \mu mol.L^{-1}$  avec un coefficient de détermination particulièrement satisfaisant ( $R^2 = 0,9958$ ) pour la glycine et jusqu'à  $500 \mu mol.L^{-1}$  ( $R^2 = 0,9973$ ) pour l'ammonium (Figure 44).



**Figure 43 : Courbe d'étalonnage de la glycine au bout de 3 minutes de réaction à  $\lambda_{em} = 455nm$  ( $\lambda_{ex} = 335 nm$ )**



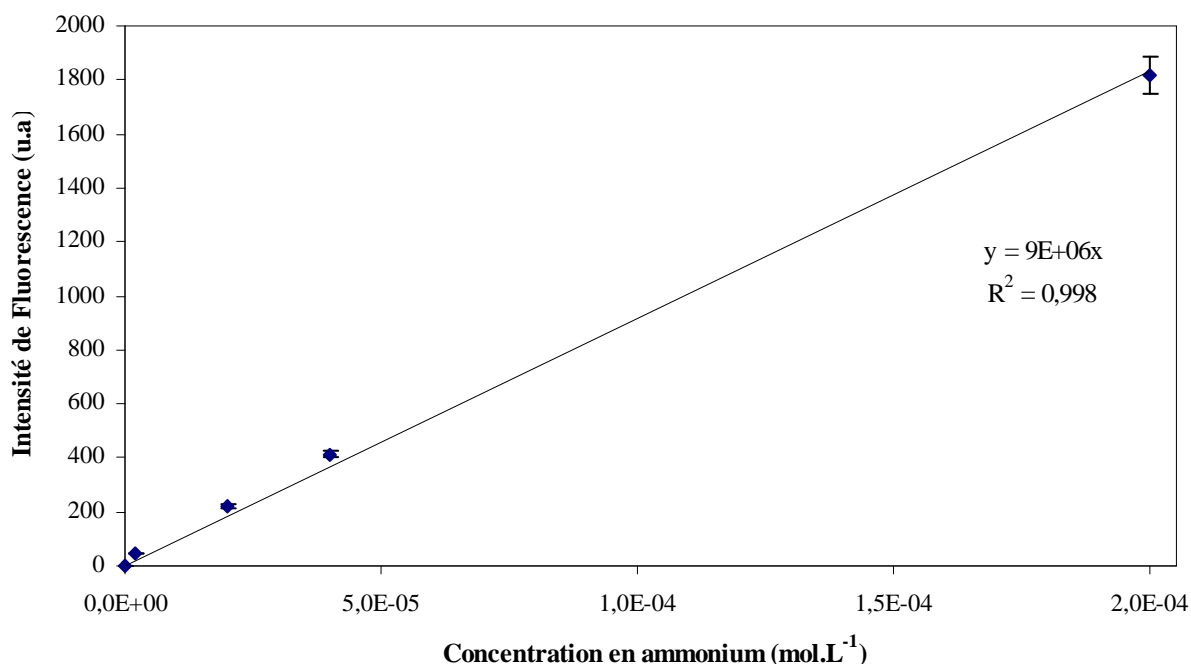
**Figure 44: Courbe de linéarité de l'ammonium au bout de 3 minutes de réaction à  $\lambda_{em} = 455$  nm ( $\lambda_{ex} = 335$  nm)**

Par ailleurs, le calcul de la limite de détection (LD) et de quantification (LQ) de la méthode a été réalisé selon les méthodes proposées par l'AFNOR (1996). La LD et LQ ont été calculées sur 10 dosages de solution de concentration nulle en analyte. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 11 pour les composés aminés et l'ammonium.

**Tableau 11 : Limites de détection et quantification de la procédure fluorimétrique pour la détermination de composés aminés et ammonium à  $\lambda_{em} = 455$  nm ( $\lambda_{ex} = 335$  nm). [OPA] = 3 mmol.L<sup>-1</sup>, [NAC] = 3 mmol.L<sup>-1</sup>, pH = 10,8**

	Glycine	Ammonium
Domaine de linéarité ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ )	0,123 - 50	3,15 - 500
Limite de détection ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ )	0,0369	0,944
Limite de quantification ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ )	0,123	3,15
Coefficient de corrélation ( $R^2$ )	0.9977	0.9966

La méthode de détection de l'ammonium à 485 nm présente une très bonne linéarité (Figure 45) et un domaine qui s'étend jusqu'à  $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$  avec un coefficient de détermination particulièrement satisfaisant ( $R^2 = 0,998$ ). Un résumé des caractéristiques analytiques est présenté dans le tableau 12.



**Figure 45: Courbe d'étalonnage de l'ammonium au bout de 6 minutes de réaction à  $\lambda_{\text{em}} = 485 \text{ nm}$  ( $\lambda_{\text{ex}} = 415 \text{ nm}$ )**

**Tableau 12 : Caractéristiques analytiques de la procédure de détermination de l'ammonium à  $\lambda_{\text{em}} = 485 \text{ nm}$  ( $\lambda_{\text{ex}} = 415 \text{ nm}$ )**

	Ammonium
Domaine de linéarité ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ )	0,655 - 200
Limite de détection ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ )	0,197
Limite de quantification ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ )	0,655
Coefficient de corrélation ( $R^2$ )	0,9979

### III.I.6. Validation de la méthode

#### III.I.6.1. Validation de la procédure de dosage des composés aminés

La méthode de référence généralement employée pour le dosage des amines est basée sur l'utilisation de la ninhydrine (2,2-dihydroxyindan-1,3-dione). Cette méthode est cependant difficile à mettre en œuvre, avec des temps de réaction relativement longs et des conditions opératoires

nécessitant de chauffer le milieu réactionnel à 90°C. D'autre part, les caractéristiques analytiques de la méthode sont plus faibles que celles obtenues par la méthode à l'OPA. La validation de la procédure analytique développée a donc été effectuée par la méthode des ajouts dosés sur des échantillons réels variés. Pour cette validation, des volumes connus d'une solution standard de glycine (10  $\mu\text{M}$ ) et d'ammonium (50  $\mu\text{M}$ ) ont été ajoutés à des extraits aqueux de sols et composts.

Les extraits aqueux de sols et composts ont été obtenus à partir de 20g d'échantillon sec mélangés avec 40 ml d'eau ultra pure. Ce mélange est agité pendant 15 minutes à température ambiante. La solution est ensuite centrifugée à 12000 rpm pendant 10 minutes. Le surnageant est filtré et recueilli dans un flacon en verre brun. Le protocole pour la détection des amines et de l'ammonium a été appliqué en microplaque avec une dilution par deux des sols, par dix pour le compost1 et par 200 pour le compost2.

Les résultats obtenus (Tableaux 13 et 14) montrent une bonne adéquation avec les concentrations des standards ajoutées, principalement dans les échantillons de sols (faible coloration des échantillons). Par contre les échantillons de composts présentent une très forte coloration et une importante autofluorescence, due probablement à la présence de substances humiques, ce qui explique l'effet de quenching sur l'intensité de fluorescence du dérivé formé. Ce type d'échantillon nécessite donc une dilution plus importante.

**Tableau 13: Détermination de l'ammonium dans différents échantillons à  $\lambda_{\text{em}} = 485 \text{ nm}$  ( $\lambda_{\text{ex}} = 415 \text{ nm}$ ).**

Echantillon	Concentration $\text{NH}_4^+$ dans les sols ( $\mu\text{M}$ ) avec OPA-NAC à $\lambda_{\text{em}} = 485\text{nm}$		Différence ( $\mu\text{M}$ )	% $\text{NH}_4^+$ détecté
	Avant l'addition de $\text{NH}_4^+$	Après l'addition 50 $\mu\text{M}$ $\text{NH}_4^+$		
Sol 1	0	49,5	49,5	99
Sol 2	2,6	51	48,4	96,8
Sol 3	0	48	48	96
Sol Traité	185	233	48	96
Compost 1	140	160	20	40
Compost 2	22	67	45	90

**Tableau 14 : Détermination des composés aminés dans différents échantillons à  $\lambda_{em} = 455$  nm ( $\lambda_{ex} = 335$  nm)**

Echantillon	Concentration Glycine dans les sols ( $\mu$ M) avec OPA-NAC à $\lambda_{em} = 455$ nm		Différence ( $\mu$ M)	% Glycine détecté
	Avant l'addition de Glycine	Après l'addition 10 $\mu$ M Glycine		
Sol 1	0,9	10,4	9,5	95
Sol 2	1,63	10,8	9,17	91,7
Sol 3	0	9,6	9,6	96
Sol Traité	5,1	14,3	9,2	92
Compost 1	112,6	114	1,4	14
Compost 2	3	11	8	80

La procédure développée permet donc de détecter de faibles concentrations d'amines et d'ammonium grâce à un protocole simple, rapide et spécifique, adapté à la technique de mesure en microplaques.

#### III.1.6.2. Validation de la procédure de dosage de $\text{NH}_4^+$

Afin de valider la procédure analytique proposée pour la détection de  $\text{NH}_4^+$  en microplaque avec le réactif OPA-NAC à  $\lambda_{em}=485\text{nm}$ , nous avons comparé les résultats obtenus sur des échantillons réels avec une méthode de chromatographie ionique.

L'ensemble des modules de la chromatographie ionique (Dionex - ICS3000) est piloté par le logiciel CHROMELEON (Dionex, version 6.80). Les conditions opératoires utilisées pour le dosage de l'ammonium sont précisées ci-dessous :

Elution isocratique : 70% A / 30%B

Pression (colonne) : 1124 psi

Température : 40°C

Débit : 1 ml/min

Eluant :A :  $\text{H}_2\text{O}$

B : 100 mM Acide méthanesulfonique

Temps rétention  $\text{NH}_4^+$  : 6,7 minutes

Détecteur conductimétrique : Conductivity detector Dionex

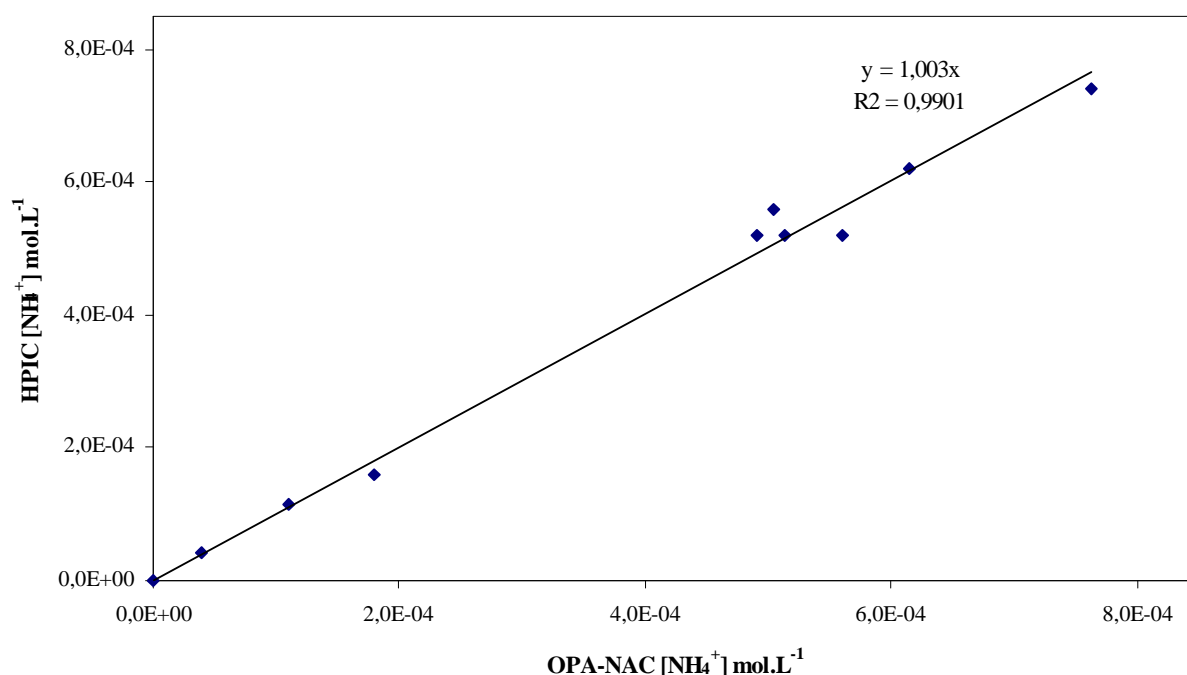
Suppresseur électrochimique : CSRS-Ultra 4mm

Colonne : IonPac CS16 (5×250 mm)

Colonne de garde : IonPac CG16 5×50 mm

Neuf échantillons ont été analysés au cours de cette validation. Ils sont constitués de boues de station d'épuration et de boues de méthanisation. Les échantillons de boues ont été centrifugés et filtrés sur un filtre en polyéthersulfone (PES) de 0,8  $\mu\text{m}$  de diamètre de pores.

La droite de régression (Figure 46), établie entre les résultats obtenus par la méthode de quantification de l'ammonium à  $\lambda_{\text{em}}=485\text{nm}$  en microplaque et ceux obtenus par la méthode de référence (chromatographie ionique), présente une pente très proche de 1, ce qui montre une bonne justesse des résultats obtenus par la méthode développée. Le coefficient de corrélation obtenu de 0,9901 pour la détermination de l'ammonium est très satisfaisant.



**Figure 46 : Droite de corrélation entre les résultats obtenus par la méthode proposée et ceux obtenus par chromatographie ionique.**

### **III.1.7. Conclusion**

La méthode analytique développée pour la détermination des composés aminés en microplaque avec détection par fluorescence offre des avantages significatifs par rapport aux procédures classiques de détection des composés aminés, principalement des amines primaires et acides aminés libres dans les extraits aqueux. La mise au point d'une méthode spécifique pour la détection de l'ammonium a permis de s'affranchir des problèmes de quantification des composés aminés générés par la présence de l'ammonium, et l'utilisation d'un seul puits pour la quantification des deux composés fait que la méthode proposée est simple, rapide et spécifique et adaptée à la technique de mesure en microplaques.



## III.2. Mise au point d'un kit microplaque pour la détection fluorimétrique des thiols.

### III.2.1. Présentation des paramètres influençant la dérivation et la détection des thiols.

#### III.2.1.1. Optimisation de l'étape de dérivation

Les études bibliographiques sur la formation et la stabilité de composés isoindoles fluorescents résultant de la réaction entre les composés thiols et l'OPA (cf. Chapitre II) ont mis en évidence l'influence de différents facteurs. Ces paramètres sont les suivants:

- Concentration en OPA
- Pourcentage de solvant organique dans la solution
- Structure de l'amine
- pH de dérivation
- Temps de réaction
- Ordre d'ajout des réactifs
- Ratio OPA : Thiol
- Ratio OPA : Amine

L'étude de ces paramètres (notés X) s'est faite en deux temps. Dans une première étape, un plan de criblage des différents facteurs a été entrepris afin de mettre en évidence les facteurs les plus influents sur l'intensité de fluorescence et la stabilité du composé isoindole<sup>1</sup> obtenu (réponses du plan, notées Y), en présence de différents thiols. Dans une deuxième étape, un plan d'expériences a été appliqué afin de déterminer la valeur optimale pour chaque paramètre établi dans le plan de criblage. L'utilisation des plans d'expérience permet d'étudier les systèmes par une approche multivariable (cf. chapitre II).

#### III.2.1.1.1. Plan de criblage

Pour évaluer l'influence des facteurs énoncés ci-dessus, un plan de criblage à 8 facteurs (avec 2 ou 3 niveaux pour chacun d'eux) a été établi. Le domaine d'étude (gamme étudiée en fonction des

---

<sup>1</sup> Le dérivé isoindole est considéré comme stable si son intensité de fluorescence ne varie pas de plus de 5% en 30 minutes.

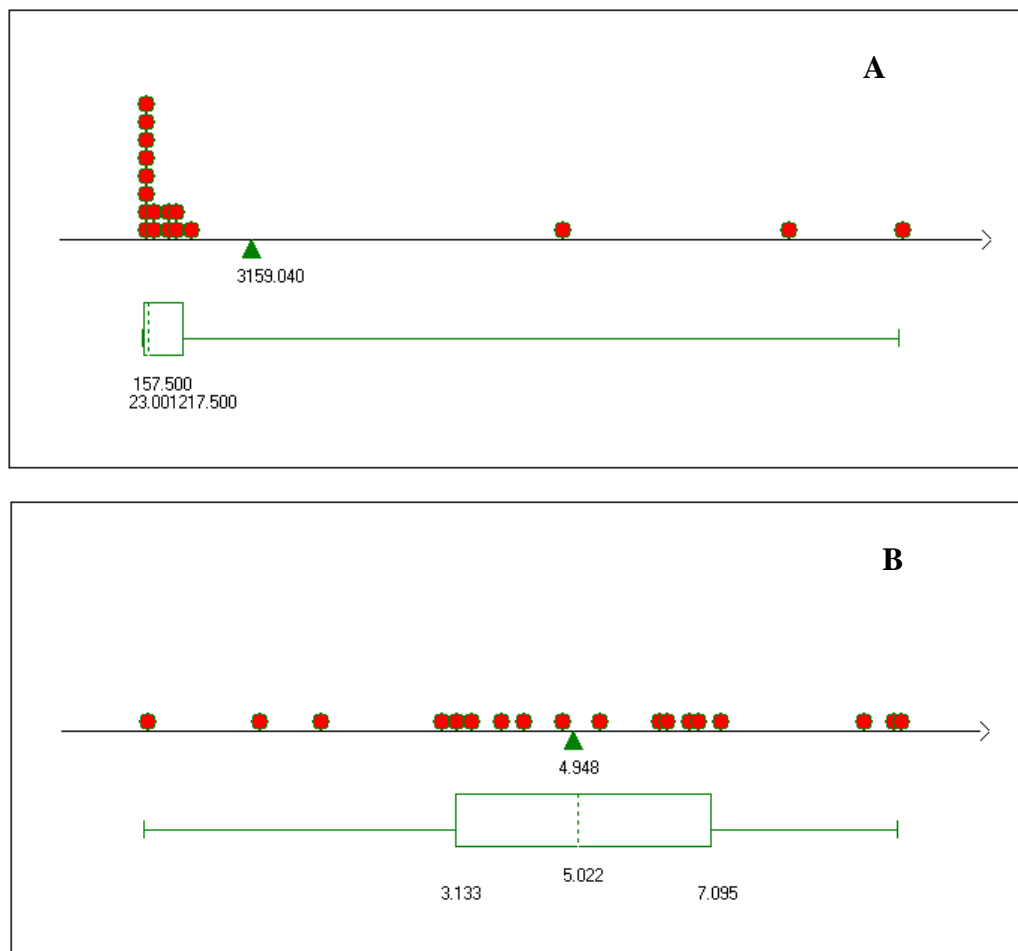
facteurs testés) est représenté dans le tableau 15. L'influence des facteurs a été appliquée à différents thiols : glutathion (GSH), cystéine (CYS), acide 3-mercaptopropionique (3MPA), qui sont les principaux thiols trouvés dans les différents compartiments de l'environnement. Cette étude a été élaborée en collaboration avec le professeur Michelle SERGENT de l'Institut des Sciences Moléculaires de Marseille (ISM2) de l'Université Paul Cézanne

**Tableau 15 : Domaine expérimental du plan de criblage pour l'analyse de facteurs influant la dérivation de thiols.**

	Facteur	Nombre Niveaux	Niveaux
A	% H <sub>2</sub> O	1	25 %
		2	75 %
B	[OPA]	1	10 mmol.L <sup>-1</sup>
		2	100 mmol.L <sup>-1</sup>
C	Amine	1	Aminoéthanol
		2	Tributylamine (TBA) / Butylamine (BA) / N-Acetyl-L-Lysine (NALL)
D	pH	1	8
		2	10
E	Ordre intro	1	(RSH+OPA)+NH <sub>2</sub>
		2	(OPA+NH <sub>2</sub> )+RSH
F	Temps réaction	1	5 min
		2	15 min
G	Ratio OPA/RSH	1	2/1
		2	30/1
H	Ratio NH <sub>2</sub> /OPA	1	2
		2	50
		3	100

Du fait du nombre de facteurs et des gammes étudiées, la plupart des valeurs obtenues sont majoritairement regroupées, ce qui traduit l'impossibilité de l'exploitation directe des résultats du

plan de criblage (Figure 47A). Pour pallier cet inconvénient, il est nécessaire de traduire les réponses expérimentales (tableau 16) en échelle logarithmique; la répartition des réponses devient alors beaucoup plus homogène, ce qui permet de mieux discriminer les effets des facteurs (Figure 47B).

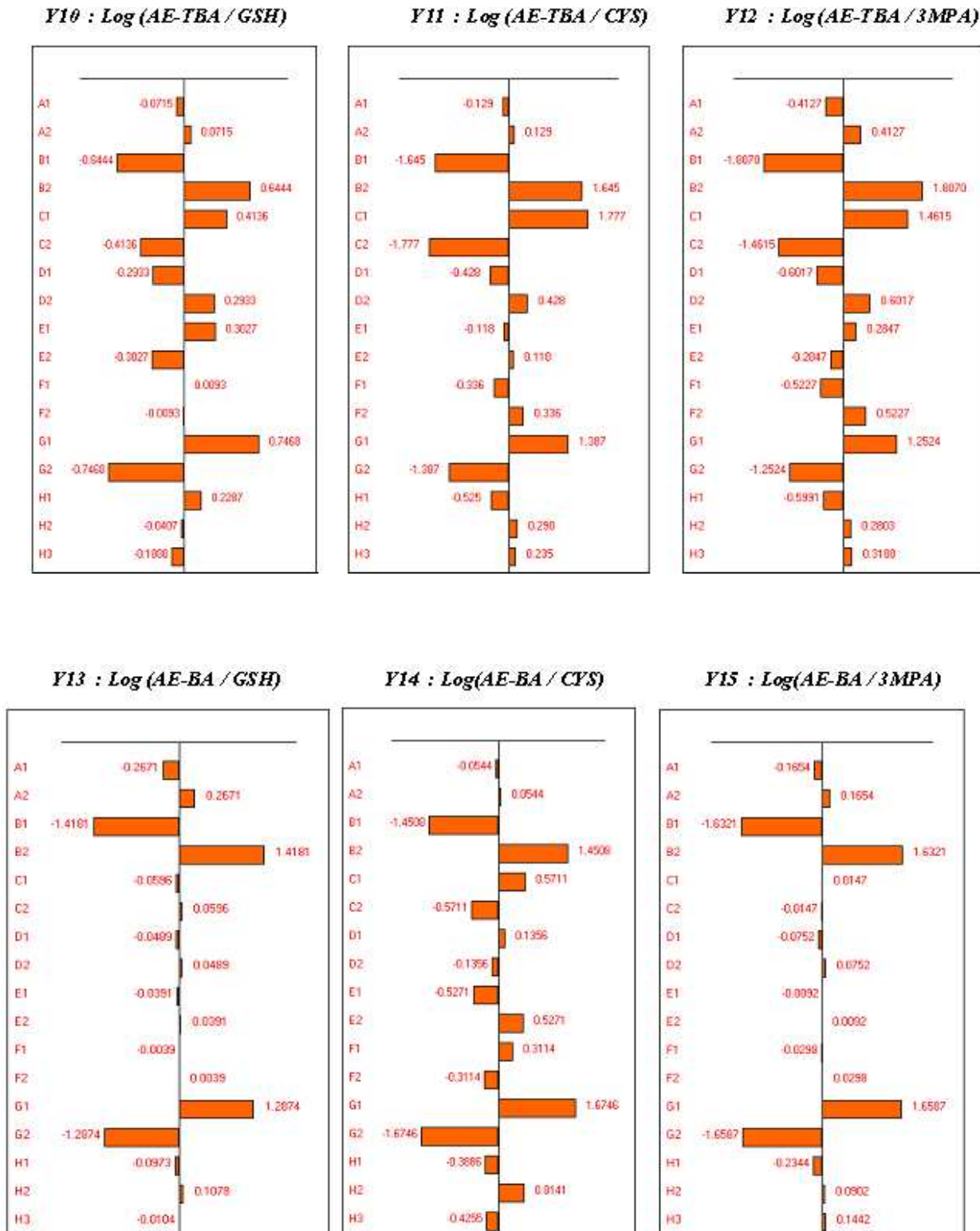


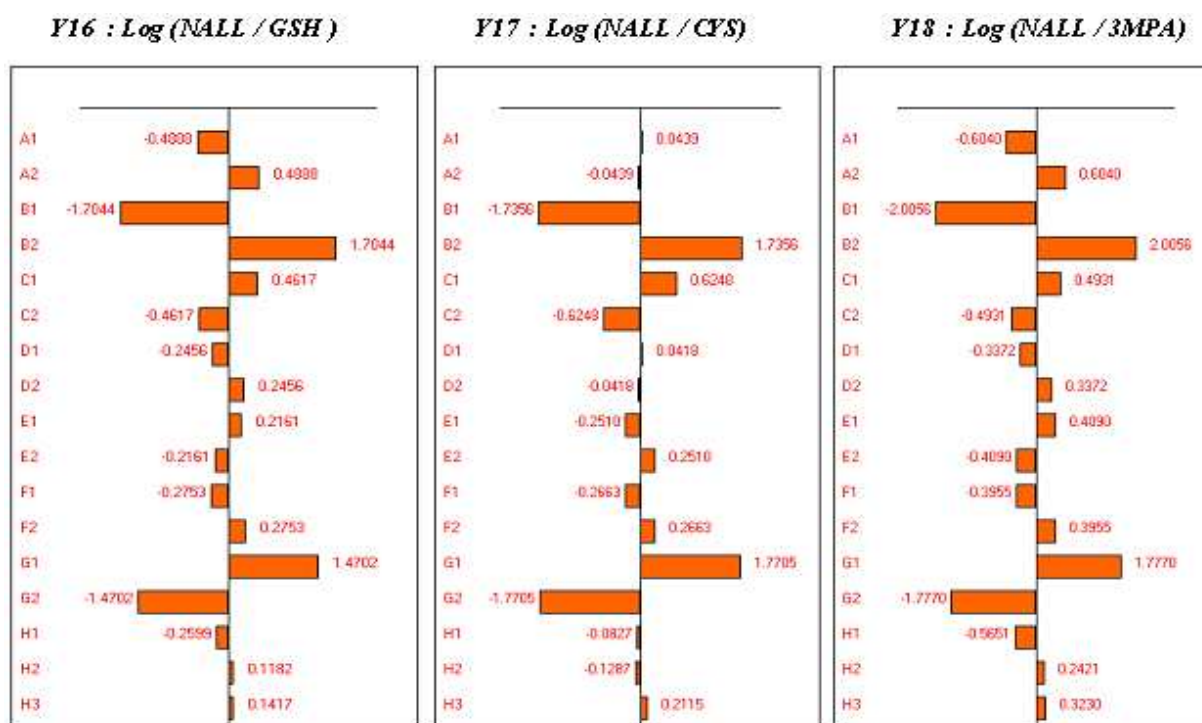
**Figure 47: Comportement de réponses obtenues après le plan de criblage. A. Réponses normales. B. Réponses type Logarithme**

**Tableau 16: Réponses expérimentales étudiées lors du criblage des facteurs influençant la dérivation des thiols avec l'OPA.**

	Réponse		Réponse
Y1	AE-TBA / GSH	Y10	Log (AE-TBA / GSH)
Y2	AE-TBA / CYS	Y11	Log (AE-TBA / CYS)
Y3	AE-TBA / 3MPA	Y12	Log (AE-TBA / 3MPA)
Y4	AE-BA / GSH	Y13	Log (AE-BA / GSH)
Y5	AE-BA / CYS	Y14	Log(AE-BA / CYS)
Y6	AE-BA / 3MPA	Y15	Log(AE-BA / 3MPA)
Y7	AE-NALL / GSH	Y16	Log (AE-NALL / GSH )
Y8	AE-NALL / CYS	Y17	Log (AE-NALL / CYS)
Y9	AE-NALL / 3MPA	Y18	Log (AE-NALL / 3MPA)

Les effets des facteurs étudiés obtenus, après avoir transcrits les résultats en échelle logarithmique, peuvent être représentés graphiquement (Figure 48). L'analyse de ces résultats est basée sur la longueur de chaque barre qui est proportionnelle à la valeur absolue de l'effet de chaque facteur. Une barre à droite de l'axe central indique un effet positif du facteur sur la réponse et vice-versa.



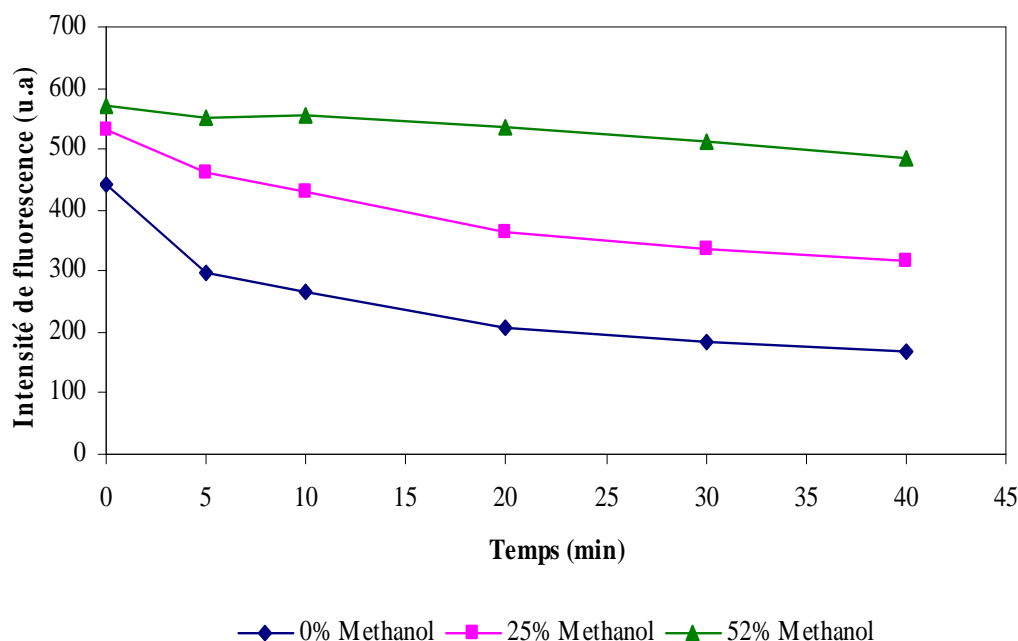


**Figure 48: Etude graphique des effets des facteurs influents, lors du plan de criblage**

Ce graphique montre que les facteurs ayant un impact sur l'intensité de fluorescence et la stabilité de l'isoindole sont, par ordre décroissant :

- la concentration en OPA (sur l'intensité et la stabilité) ;
- la nature de l'amine (sur l'intensité)
- la nature de l'amine: l'aminoéthanol a montré être l'amine la plus appropriée pour obtenir une forte intensité de fluorescence.

Les autres facteurs tels que le pourcentage de solvant, l'ordre d'ajout de réactifs (en particulier pour la cystéine) et la concentration en amine montrent une influence sur la formation du dérivé, mais cette influence dépend du thiol analysé. Par exemple, le dérivé formé avec la cystéine présente plus de stabilité et d'intensité de fluorescence lorsque le pourcentage de méthanol et la concentration d'amine sont élevés (Figure 49), tandis que le dérivé formé avec le glutathion voit son intensité de fluorescence diminuer lorsque la teneur en méthanol augmente.



**Figure 49 : Influence du méthanol sur la stabilité et l'intensité de fluorescence du dérivé isoindole de la cystéine**

Afin de réaliser une étude plus approfondie des facteurs influençant la dérivation des thiols et d'établir les valeurs optimales de ces facteurs, un plan d'expériences a été mis en œuvre.

#### III.2.1.1.2. Plan d'expériences

Après avoir mis en évidence les facteurs d'incidence majeure dans la formation du dérivé fluorescent des thiols que sont la concentration en OPA ([OPA]), la concentration en amines ([NH<sub>2</sub>]), le pourcentage de solvant (%MeOH), nous avons établi un modèle empirique de type polynomial du deuxième degré afin de déterminer la valeur optimale de chaque facteur incident. Ce modèle établit la relation entre la variation de la réponse,  $\eta$ , et la variation des facteurs X. Ce modèle mathématique est de la forme :

$$\eta = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_k X_k + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \dots + \beta_{kk} X_k^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \dots + \beta_{k-1,k} X_{k-1} X_k$$

Avec :

$\eta$  : représente la variation des réponses;

k : le nombre de facteurs;

$\beta_0$  : le coefficient constant;

$\beta_i, \beta_{ii}, \beta_{ij}$  : respectivement, les coefficients des termes de degré 1, de degré 2 et des termes produits.

Comme on a pu le voir dans le chapitre précédent, l'estimation des coefficients de ce modèle, est obtenue par un ensemble d'expériences dans le domaine d'étude. Parmi les différentes matrices d'expériences existantes, nous avons choisi une matrice de Doehlert qui a une conception optimale pour le domaine sphérique défini par les facteurs.

Le tableau 17 présente le plan d'expériences de Doehlert qui a été établi et mis en œuvre afin d'obtenir les facteurs optimisés (nommé  $X_i$ ) permettant d'obtenir la meilleure stabilité possible du dérivé isoindole fluorescent (réponse expérimentale nommée  $Y$ ) pour une concentration fixe de cystéine de  $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ . Ce plan d'expérimentation comprend donc quinze expériences, sept réponses ( $Y_t$  : Intensités de fluorescence du dérivé, au bout d'un temps donné  $t$ ) et les trois facteurs les plus influents qui ont été établis lors du plan de criblage : concentration en OPA ( $X_1$ ), pourcentage de méthanol ( $X_2$ ) et concentration en aminoéthanol ( $X_3$ ) ([OPA] ; %MeOH ; [NH<sub>2</sub>]). Les domaines de variation et les niveaux pour chaque facteur ont été déterminés sur la base des premiers essais expérimentaux. Ils sont donc définis comme suit :

$X_1$  : Concentration finale en OPA : de 50 à 200.  $10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$

$X_2$  : Pourcentage de méthanol : de 15% à 85%

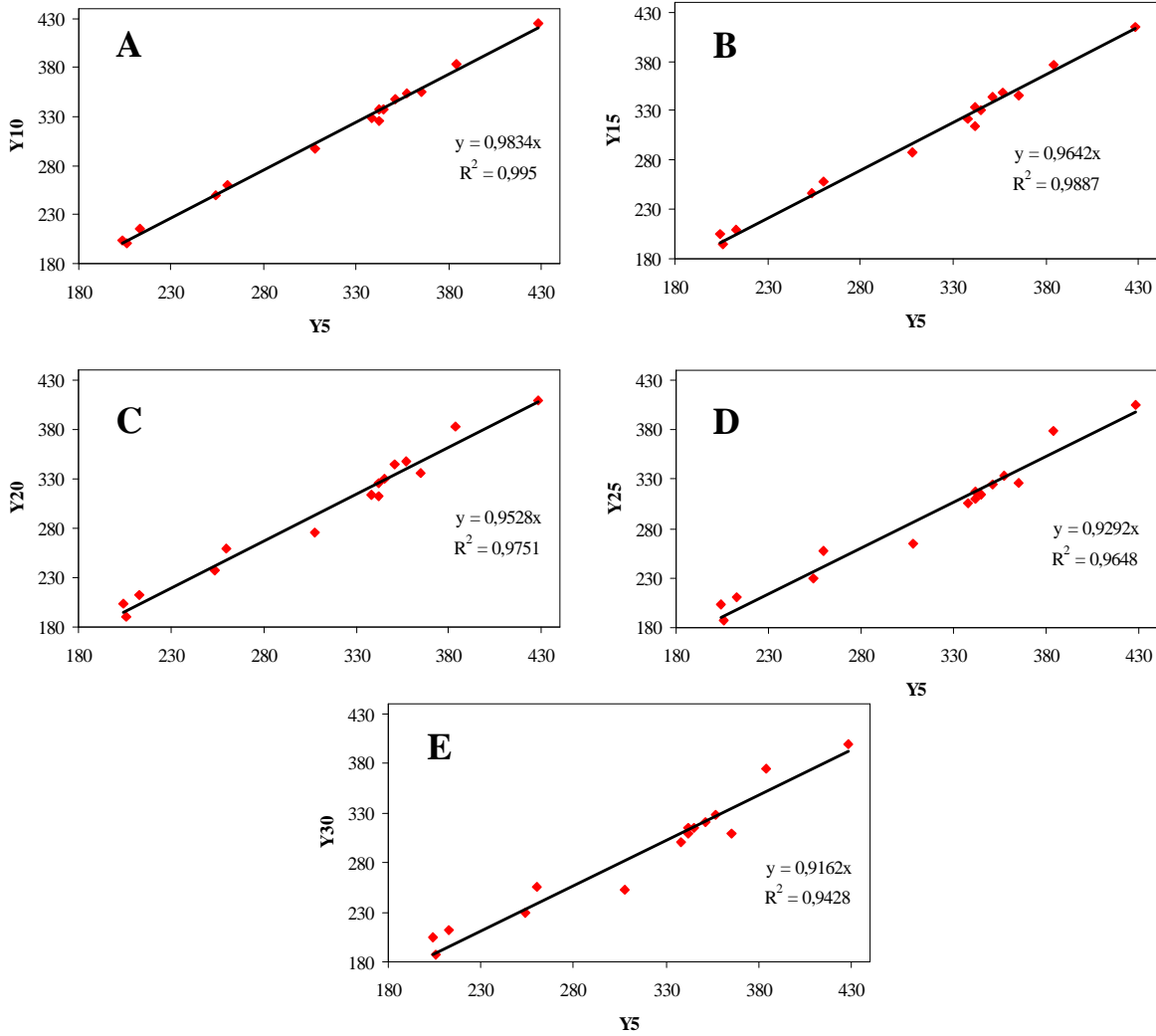
$X_3$  : Concentration finale en AE : de 2,75 à 22,75.  $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$

**Tableau 17: Plan d'expérience (matrice de Doehlert) mis en œuvre afin de déterminer les valeurs optimales des facteurs influençant la stabilité et l'intensité de fluorescence des dérivés isoindoles des composés thiols**

N°Exp	X <sub>1</sub> [OPA]	X <sub>2</sub> % MeOH	X <sub>3</sub> [NH <sub>2</sub> ]	Y <sub>0</sub>	Y <sub>5</sub>	Y <sub>10</sub>	Y <sub>15</sub>	Y <sub>20</sub>	Y <sub>25</sub>	Y <sub>30</sub>
1	20	50	1275	254	254	250	247	437	230	230
2	5	50	1275	430	428	425	415	409	405	400
3	16,25	85	1275	215	213	215	210	213	210	212
4	8,75	15	1275	380	365	355	345	336	326	310
5	16,25	15	1275	320	308	298	288	276	264	252
6	8,75	85	1275	250	260	260	259	260	258	255
7	16,25	62	2275	340	342	338	334	325	318	315
8	8,75	38	275	354	342	325	314	312	310	309
9	16,25	38	275	210	206	201	195	190	188	187
10	12,5	73	275	205	204	204	205	203	204	204
11	8,75	62	2275	382	384	383	377	382	378	375
12	12,5	27	2275	340	338	328	322	313	306	300
13	12,5	50	1275	351	345	337	330	330	315	315
14	12,5	50	1275	350	351	348	344	344	325	321
15	12,5	50	1275	355	357	354	348	348	333	328

La figure 50 présente les corrélations obtenues entre les réponses Y<sub>5</sub> et Y<sub>10</sub> (A), Y<sub>5</sub> et Y<sub>15</sub> (B), Y<sub>5</sub> et Y<sub>20</sub> (C), Y<sub>5</sub> et Y<sub>25</sub> (D) et Y<sub>5</sub> et Y<sub>30</sub> (E), c'est-à-dire la variation de l'intensité de fluorescence de l'isoindole formé en fonction du temps (exprimé en minutes). L'ensemble des graphiques obtenus présente de bons coefficients de corrélation et des pentes proches de 1, ce qui montre que les réponses sont précises et homogènes. Ceci permet d'établir que les résultats obtenus auront tous le même comportement, lors de l'élaboration des surfaces de réponse. Une comparaison entre les pentes permet de constater qu'au-delà de 20 minutes après la formation du dérivé isoindole, la perte de réponse d'intensité de fluorescence est supérieure à 4%. Par voie de conséquence, l'étude des surfaces de réponses sera effectuée avec la réponse Y<sub>10</sub>.





**Figure 50 : Corrélation entre les réponses (intensités de fluorescence) :  $Y_5$  et  $Y_{10}$  (A) ;  $Y_5$  et  $Y_{15}$  (B) ;  $Y_5$  et  $Y_{20}$  (C) ;  $Y_5$  et  $Y_{25}$  (D) ;  $Y_5$  et  $Y_{30}$  (E).**

A partir des intensités de fluorescence de l'isoindole après 10 minutes (résultats de la réponse  $Y_{10}$ ), les différents coefficients  $\beta$  ont été calculés et ont permis d'établir l'équation suivante:

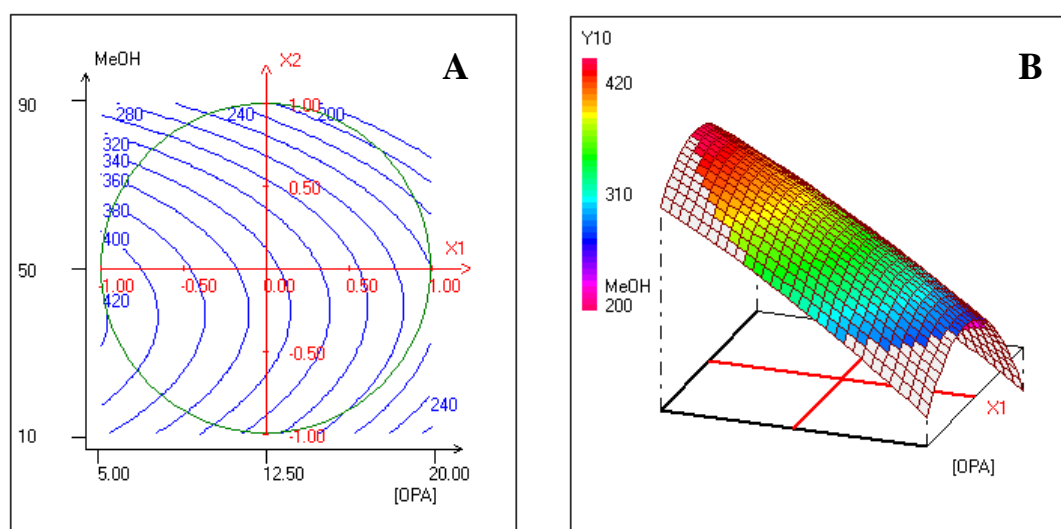
$$Y = 346.33 - 77.63 X_1 - 41.93 X_2 + 65.56 X_3 - 8.83 X_1^2 - 81.14 X_2^2 - 52.25 X_3^2 + 6.86 X_1 X_2 + 45.87 X_1 X_3 + 39.81 X_2 X_3$$

Trois expériences ont été effectuées au point central afin d'estimer la variance du système et ainsi avoir la prédiction la plus représentative de la réalité. Pour chaque réponse, les coefficients ont été calculés par régression multilinéaire.

Ce modèle a été validé en utilisant une analyse de variance (ANOVA). Dans cette analyse de variance, la régression des moindres carrés (6919,39) et le résidu quadratique moyen (415,28) ont permis le calcul des ratios de Fisher qui permettent d'évaluer les caractéristiques statistiques de ce modèle. La régression obtenue sur l'intensité de fluorescence de l'isoindole produite lors de la réaction de dérivation est de 96,8%. Cela signifie que la variation de la réponse obtenue est due à la variation des paramètres et pas uniquement en raison de l'erreur expérimentale. Après validation, ces équations ont été utilisées pour représenter les réponses dans l'ensemble du domaine et pour déterminer le paramètre le plus prépondérant dans la formation du dérivé isoindole.

#### III.2.1.1.2.1. Effet du pourcentage de méthanol

Dans un premier temps, l'influence du pourcentage de méthanol a été étudiée: le ratio MeOH/H<sub>2</sub>O est en effet soupçonné d'avoir un effet important sur la stabilité et sur l'intensité de l'isoindole formé. Les représentations en 2D et 3D (Figure 51) montrent les surfaces de réponses obtenues en faisant varier simultanément les concentrations d'OPA et le volume de méthanol (MeOH), avec une concentration fixe d'aminoéthanol à 12,75 mmol.L<sup>-1</sup>.



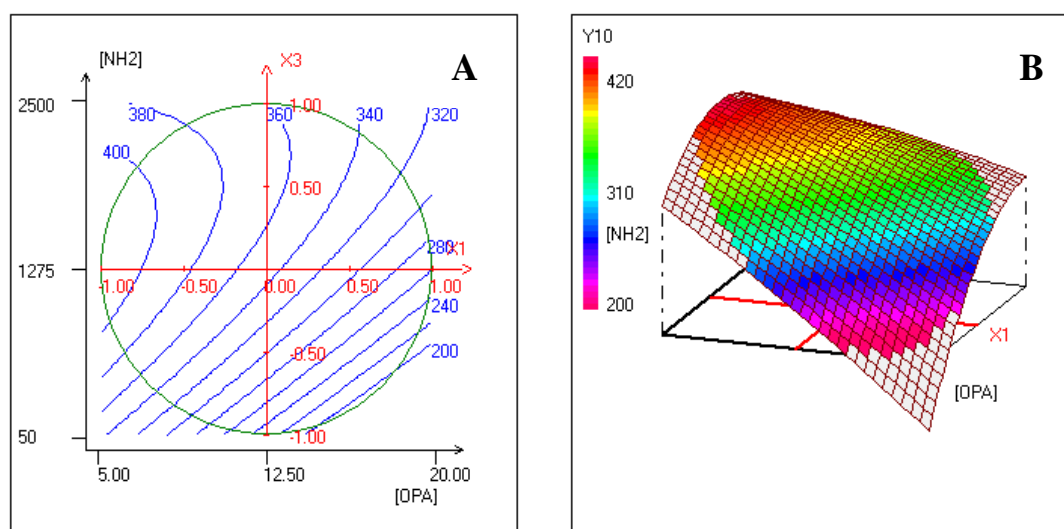
**Figure 51 : Courbes de niveau (A) et de surface de réponse (B) montrant la variation de la réponse Y10 (Intensité de fluorescence) en fonction de [OPA] (X<sub>1</sub>) et le pourcentage de méthanol (X<sub>2</sub>). La concentration en AE a été fixée à 12,75 mmol.L<sup>-1</sup>.**

Ces résultats montrent une forte courbure sur l'axe % MeOH, traduisant la forte influence de la teneur en CH<sub>3</sub>OH dans le solvant réactionnel sur l'intensité de fluorescence de l'isoindole. Ainsi

l'intensité de fluorescence est maximale lorsque cette teneur représente 40 à 50% du volume total de solvant réactionnel. D'autre part, ces graphiques dévoilent la forte influence de la concentration en OPA ([OPA]): lorsque la concentration est faible, la réponse est élevée (intensité de fluorescence de 420 avec une concentration de 50  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  d'OPA). Au plus la concentration augmente, au plus le signal de fluorescence diminue ; la réponse étant maximale, lorsque [OPA] et % MeOH sont élevés.

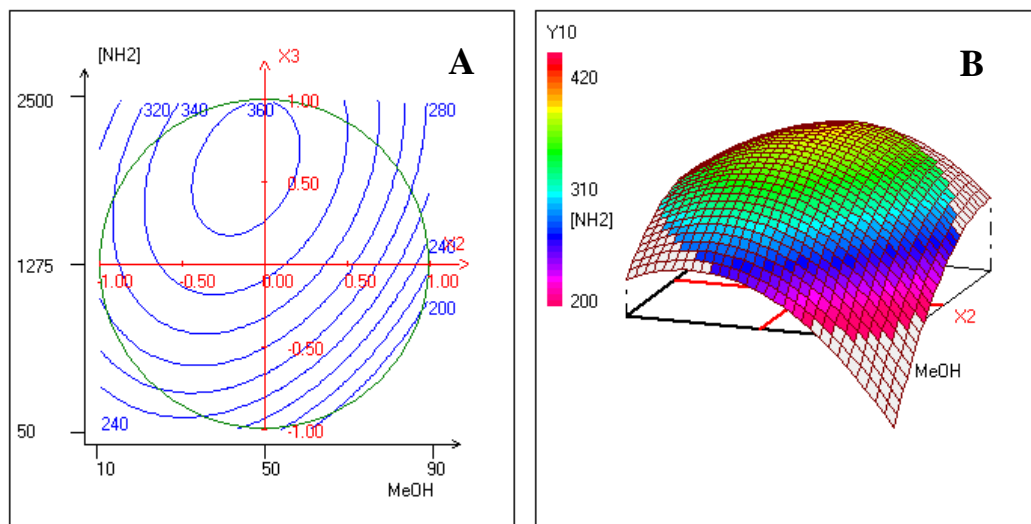
### III.2.1.1.2.2. Effet de la concentration en aminoéthanol

La figure 52 présente le rôle prépondérant de la concentration en OPA sur celui de la concentration en AE. En effet, la réponse obtenue lors des analyses montre que l'intensité de fluorescence est maximale pour des concentrations faibles en OPA, quelle que soit la concentration en AE. A l'opposé, la réponse en intensité de fluorescence est beaucoup plus faible lorsque la concentration en OPA augmente et que celle en AE diminue.



**Figure 52 : Courbes de niveau (A) et de surface de réponse (B) montrant la variation de la réponse Y<sub>10</sub> (Intensité de fluorescence) en fonction de [OPA] (X<sub>1</sub>) et [AE] (X<sub>3</sub>). Le pourcentage de méthanol dans le solvant réactionnel a été fixé à 50%.**

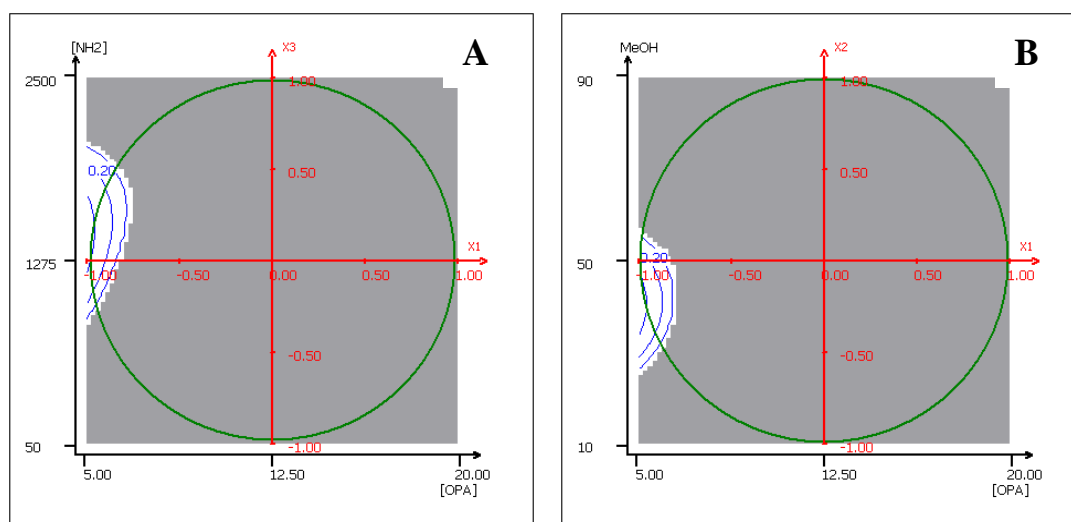
Le graphique de la figure 53 présente la variation de l'intensité de fluorescence en fonction du pourcentage de MeOH et de la concentration en aminoéthanol. La réponse obtenue (Y<sub>10</sub>) donne des conclusions similaires aux précédentes études. Ainsi, la réponse est maximale pour des teneurs moyennes en MeOH, et est minimale pour des valeurs de MeOH élevées et des concentrations en AE faibles.



**Figure 53 : Courbes de niveau (A) et de surface de réponse (B) montrant la variation de la réponse  $Y_{10}$  (Intensité de fluorescence) en fonction de [%MeOH] ( $X_2$ ) et [AE] ( $X_3$ ). La concentration en OPA a été fixée à 125  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ .**

### III.2.1.1.3. Désirabilité

Afin de connaître les conditions opératoires précises permettant d'avoir une bonne stabilité du dérivé avec le maximum d'intensité, nous avons déterminé un domaine de désirabilité qui répond aux critères recherchés. Une fonction de désirabilité est associée à chaque réponse. Elle est calculée sur chaque point du domaine afin d'obtenir les zones de désirabilité souhaitée. L'évolution de cette fonction de désirabilité dans le domaine expérimental étudié est représentée par la figure 54.



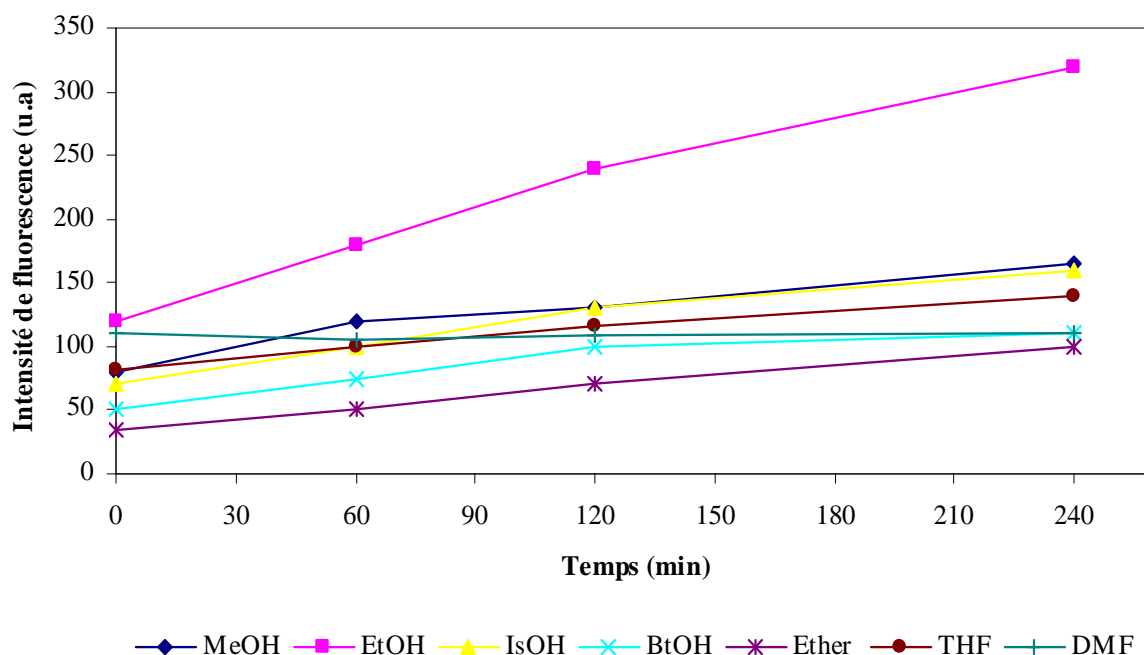
**Figure 54 : Courbes d'isoréponses de la fonction de désirabilité. (A) concentration en OPA, concentration en aminoéthanol avec 43% MeOH (facteur fixe). (B) Concentration en OPA et %MeOH avec [AE] de 14  $\text{mmol.L}^{-1}$  (facteur fixe).**

La figure 54A représente la variation de la désirabilité en fonction de la concentration en OPA (axe horizontal) et la concentration en aminoéthanol (axe vertical) pour un pourcentage de MeOH fixé à 43%. Sur la figure 54B, la concentration en aminoéthanol est fixée à 14 mmol.L<sup>-1</sup> et la variation de la désirabilité est étudiée en fonction de la concentration en OPA et le pourcentage de MeOH. Les réponses optimales obtenues d'après les courbes isoréponses dans les domaines établis sont donc de l'ordre de : 13,5 mmol.L<sup>-1</sup> pour la concentration en aminoéthanol, de 50 mmol.L<sup>-1</sup> pour la concentration en OPA, avec une teneur en méthanol dans le solvant réactionnel de 43%.

L'optimisation des différents paramètres étudiés a permis d'obtenir les conditions opératoires idéales permettant de former un dérivé isoindole, résultant de la réaction OPA-NH<sub>2</sub> avec des composés thiols réduits, présentant un signal de fluorescence élevé et stable. Ces différents paramètres vont être mis en œuvre afin de développer la méthode de dosage des thiols totaux (réduits et oxydés).

#### III.2.1.2. Optimisation de l'étape de réduction

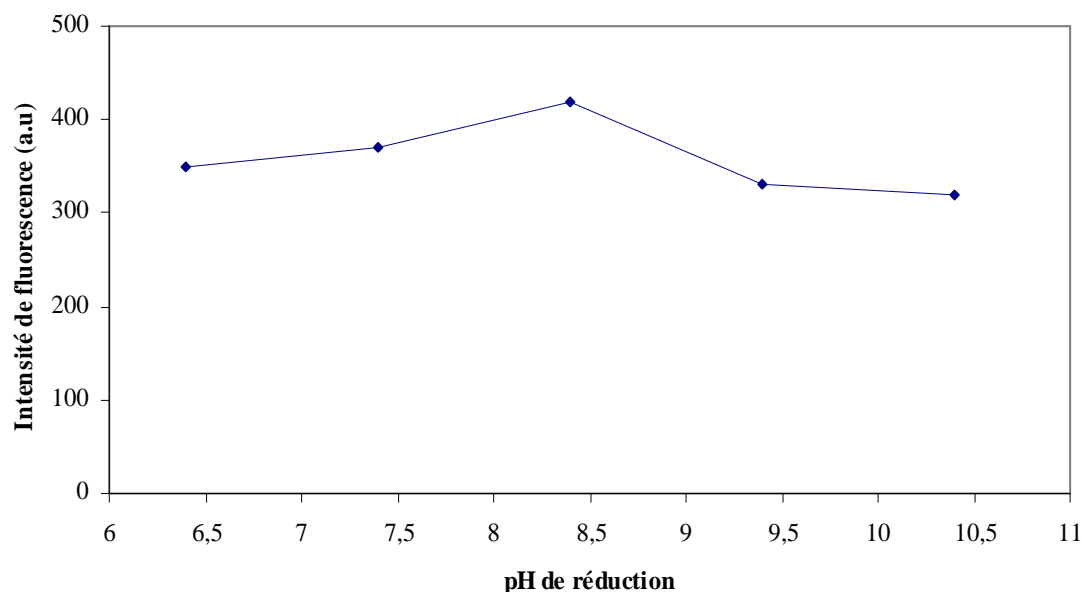
Afin d'obtenir un rendement maximum de cette étape de réduction, le pH, le temps de réduction, la concentration de TBP ont été optimisés ainsi que le choix du solvant de solubilisation du TBP. En effet, le TBP présente une solubilité quasi-nulle dans l'eau, ce qui a nécessité une étude de différents solvants autorisant sa solubilisation, et une étude sur la stabilité de ce réducteur dans les solvants tels que : méthanol (MeOH), éthanol (EtOH), isoéthanol (IsOH), butanol (BtOH), éther, tétrahydrofurane (THF) et diméthylformamide (DMF).



**Figure 55: Stabilité du dérivé fluorescent après réduction de CSSC avec TBP préparé dans les différents solvants testés à :  $\lambda_{em} = 445 \text{ nm}$  ( $\lambda_{ex} = 335 \text{ nm}$ ),  $\text{pH} = 9,5$ ,  $[\text{OPA}] = 50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ,  $[\text{AE}] = 13,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ .**

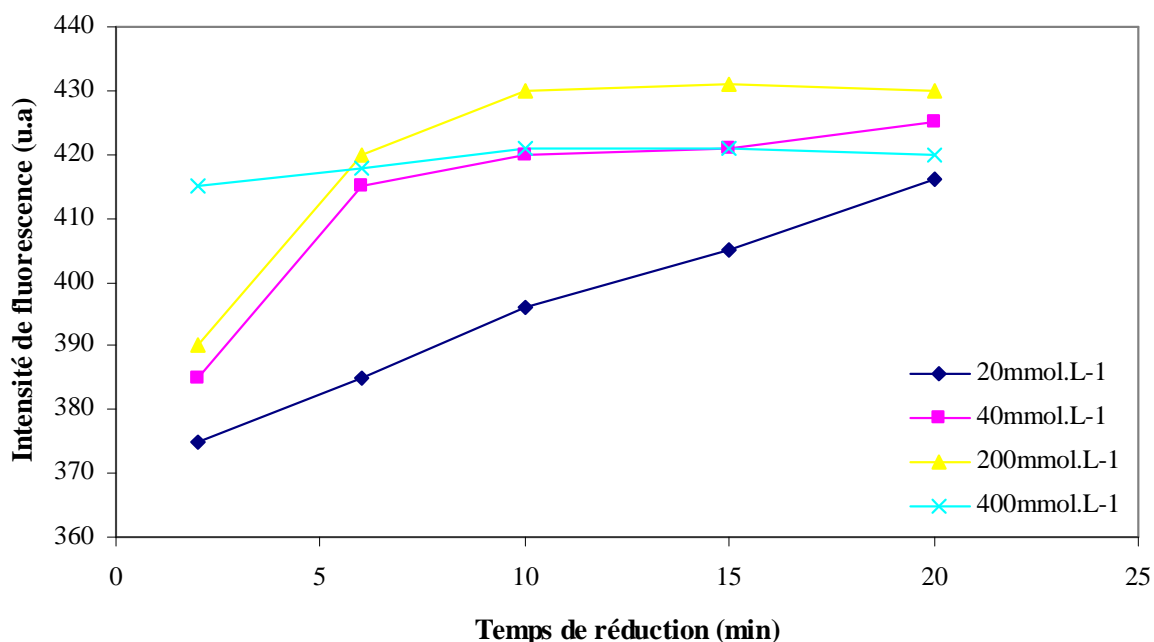
Comme observé dans la figure 55, le solvant utilisé pour préparer la solution réductrice de phosphine est un facteur prépondérant au moment de la réduction des thiols oxydés, puisque si l'intensité de fluorescence varie en fonction du temps, la quantification sera inexacte. Compte tenu de ces résultats, le diméthylformamide (DMF) semble donc être le solvant le plus approprié, permettant de conserver le TBP pendant 5 jours sans changement dans l'intensité de fluorescence.

La mesure de l'intensité de fluorescence des thiols oxydés, après l'étape de réduction, et la dérivation avec l'OPA-AE en fonction du pH permet d'observer une émission maximale à pH 8,4 (Figure 56). Ceci signifie qu'une variation de pH au moment de la réduction donnera lieu à une diminution de l'intensité de fluorescence du dérivé isoindole formé. Il est donc nécessaire de tamponner l'échantillon pendant l'étape de réduction. Pour cela une solution de tampon borate à  $100 \text{ mmol.L}^{-1}$  (pH 8,4) est utilisée.



**Figure 56: Influence du pH sur dans l'étape de réduction à :  $\lambda_{em} = 445$  nm ( $\lambda_{ex} = 335$ nm),  $[OPA] = 50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ,  $[AE] = 13,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , MeOH= 43%**

La figure 57 présente la cinétique de réduction de CSSC à température ambiante (23°C) et à pH 8,4 pour une solution de TBP de 200 mM. Les résultats montrent que la dérivation de l'isoindole après la réduction de CSSC est complète au bout de 10 minutes.



**Figure 57 : Cinétiques de réduction de CSSC à différents concentrations de TBP à  $\lambda_{em} = 445$  nm ( $\lambda_{ex} = 335$  nm), pH= 9.5,  $[OPA] = 50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ,  $[AE] = 13,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ , MeOH= 43%**

Avec les différents paramètres optimisés, le pourcentage de réduction de CSSC calculé est de 90% en 10 minutes en utilisant une concentration en TBP de 200 mM dans le DMF et avec un échantillon tamponné à pH 8,4.

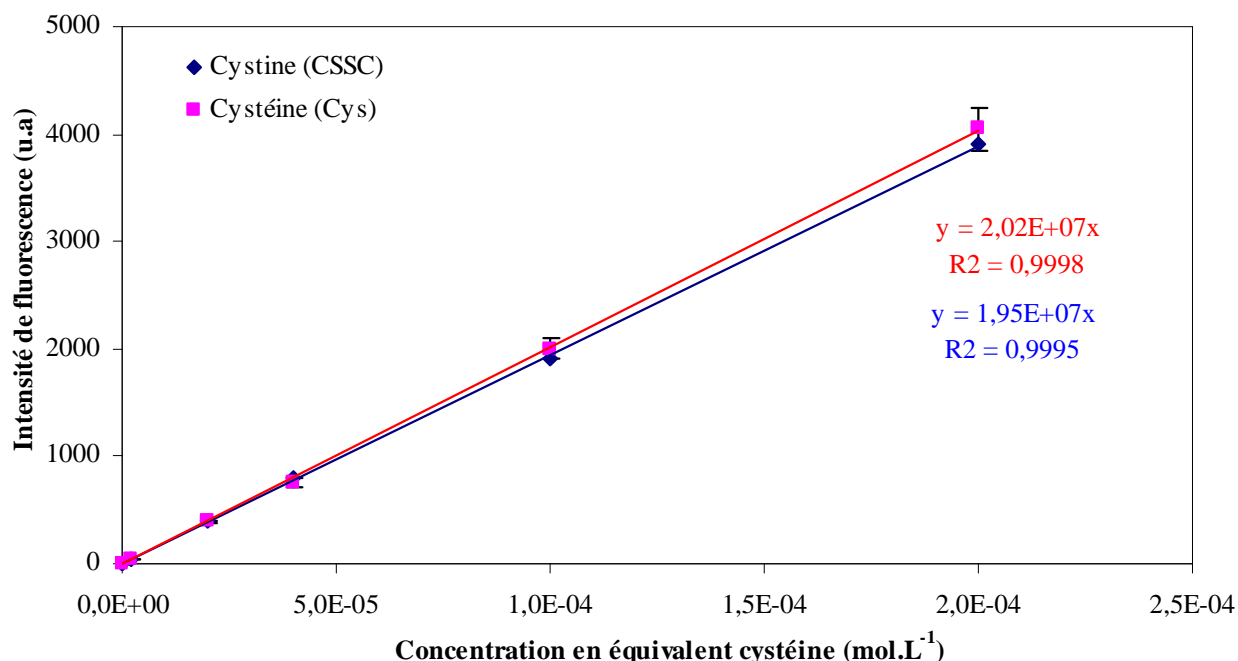
### **III.2.2. Détermination des caractéristiques analytiques de la détection fluorimétrique.**

Les caractéristiques analytiques permettront de définir les conditions d'utilisation de la méthode en vue de son application à la détection de thiols totaux. La détermination de ces caractéristiques se fait en deux étapes. Dans une première étape, nous allons vérifier la corrélation entre l'intensité de fluorescence et la concentration en thiols réduits à 445 nm. Cette étape permettra donc de définir le domaine de linéarité ainsi que les limites de détection et de quantification de la méthode, puis une seconde étude sera engagée afin de déterminer les interférences qui peuvent affecter le résultat analytique de la concentration en thiols.

Afin d'établir la droite d'étalonnage reliant la concentration en -RSH à l'intensité de fluorescence, des mesures sont réalisées sur différents échantillons contenant des concentrations croissantes en cystéine (Figure 55). Le domaine de linéarité s'étend jusqu'à 200  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  avec un coefficient de détermination particulièrement satisfaisant ( $R^2 = 0,9998$ ).

Pour les thiols oxydés différentes concentrations de CSSC ont été testées et le résultat obtenu montre un coefficient de détermination très satisfaisant ( $R^2 = 0,9995$ ) pour des concentrations allant jusqu'à 100  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de cystine ou 200  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de cystéine après réduction (Figure 58).





**Figure 58:** Corrélation entre l'intensité de fluorescence et les concentrations en équivalents de cystéine à  $\lambda_{em}= 445$  nm ( $\lambda_{ex}= 335$  nm), pH= 9.5, [OPA]= 50  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , [AE]= 13,5  $\text{mmol.L}^{-1}$ , MeOH= 43%, [TBP]= 200  $\text{mmol.L}^{-1}$

#### III.2.2.1. Limite de détection et limite de quantification

Les calculs de la limite de détection (LD) et de la limite de quantification (LQ) de la méthode ont été réalisés selon les méthodes proposées par l'AFNOR (XP T 90-210, 1996), et détaillées dans l'annexe 6. Dans le cas de cette étude, la limite de détection et quantification ont été calculée sur 10 déterminations successives d'un échantillon sans thiols. Les résultats obtenus pour les limites de quantification et de détection sont représentés dans le tableau suivant :

**Tableau 18:** Limites de détection et quantification de la procédure fluorimétrique à  $\lambda_{em}= 445$  nm ( $\lambda_{ex}= 335$  nm), pH= 9.5, [OPA]= 50  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , [AE]= 13,5  $\text{mmol.L}^{-1}$ , MeOH= 43%, [TBP]= 200  $\text{mmol.L}^{-1}$

Thiol de Référence	Cystéine (Cys)	Cystine (CSSC)
Domaine de linéarité ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ )	0,6 - 200	100
Limite de détection ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ )	0,18	0,19.
Limite de quantification ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ )	0,60	0,62
Coefficient de corrélation ( $R^2$ )	0.9998	0.9995

Les limites de détection obtenues constituent les valeurs basses de nos gammes d'application. Les valeurs de concentrations obtenues par notre méthode de dosage pourront être considérées comme fiables pour des seuils supérieurs ou égales à la limite de quantification ( $0,6 \mu\text{mol.L}^{-1}$  pour la cystéine et  $0,62 \mu\text{mol.L}^{-1}$  pour la cystine).

#### III.2.2.2. Etude des interférences

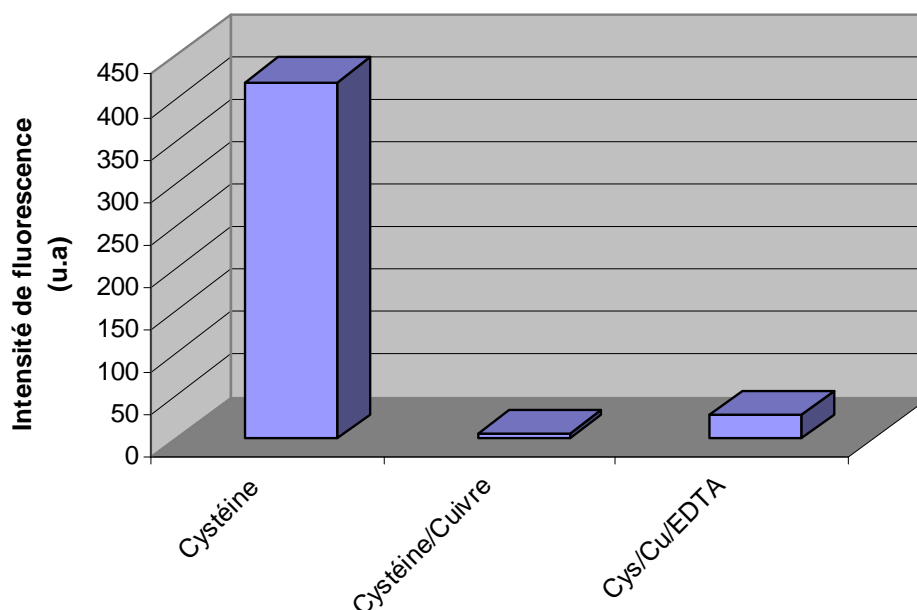
Une étude des interférents potentiels à la méthode de détection a été réalisée. A cette fin, nous avons effectué la détermination de la cystéine au sein de plusieurs mélanges contenant chacun un élément potentiellement interférent. Ces éléments ont été choisis en tenant compte de leur réactivité vis-à-vis des composés thiols (comme les métaux), ou de leur quenching ou de leur réactivité avec l'un de composants utilisés dans la méthode.

Le résultat obtenu sera comparé à la mesure réalisée sur une solution contenant seulement de la cystéine. Pour les différents mélanges réalisés, les conditions expérimentales de dérivation utilisées ont été analogues à celles décrites précédemment. La concentration en cystéine (Cys) utilisée dans tous les mélanges a été fixée à  $2 \mu\text{mol.L}^{-1}$ . Les différents résultats obtenus sont consignés dans le tableau 19 présenté page suivante.

**Tableau 19 : Effets de différents éléments sur la fluorescence du dérivé isoindole à  $\lambda_{em}= 445$  nm ( $\lambda_{ex}= 335$ nm), pH= 9.5, [OPA]= 50  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , [AE]= 13,5  $\text{mmol.L}^{-1}$ , MeOH= 43%, [TBP]= 200  $\text{mmol.L}^{-1}$**

	Concentration interférents [mg/L]	% Intensité de Fluorescence
Cystéine (2 $\mu\text{M}$ )	0	100
$\text{Al}^{3+}$	2	100
Se(IV)	1	96,4
$\text{Fe}^{3+}$	5	56,0
$\text{Fe}^{2+}$	1	23,1
$\text{Cu}^{2+}$	10	1,8
$\text{Mn}^{2+}$	10	64,3
$\text{Zn}^{2+}$	10	11,9
$\text{Co}^{2+}$	0,5	3,8
$\text{Ni}^{2+}$	0,5	13,3
$\text{Cd}^{2+}$	0,5	13,8
$\text{Mg}^{2+}$	25	99,0
$\text{Ca}^{2+}$	100	99,8
$\text{Na}^{+}$	100	95,5
$\text{K}^{+}$	100	94,0
$\text{NH}_4^{+}$	1	96,0
$\text{PO}_4^{3-}$	1	92,9
$\text{CO}_3^{-}$	10	89,3
$\text{NO}_2^{-}$	5	89,3
$\text{NO}_3^{-}$	50	94,0
$\text{SO}_4^{2-}$	250	96,4
$\text{Cl}^{-}$	200	96,4

Les résultats obtenus nous permettent de constater que les métaux interfèrent considérablement sur la dérivation et la détection des thiols. Ceci peut s'expliquer par la capacité des groupements thiols à former des complexes avec les métaux. Ceci se vérifie particulièrement en présence de 10  $\text{mg.L}^{-1}$  de  $\text{Cu}^{2+}$ . Afin d'éviter la formation de ces complexes, des premiers essais ont été entrepris, ayant pour but de « jouer » sur la complexation sélective entre les groupements thiols et un « agent masquant ». Ainsi de l'EDTA à une concentration de 0.1  $\text{mol.L}^{-1}$  a été ajouté à la solution. Toutefois, comme on peut l'observer dans la figure 59, l'ajout d'EDTA ne suffit pas à empêcher le piégeage des espèces métalliques par les groupements thiols.



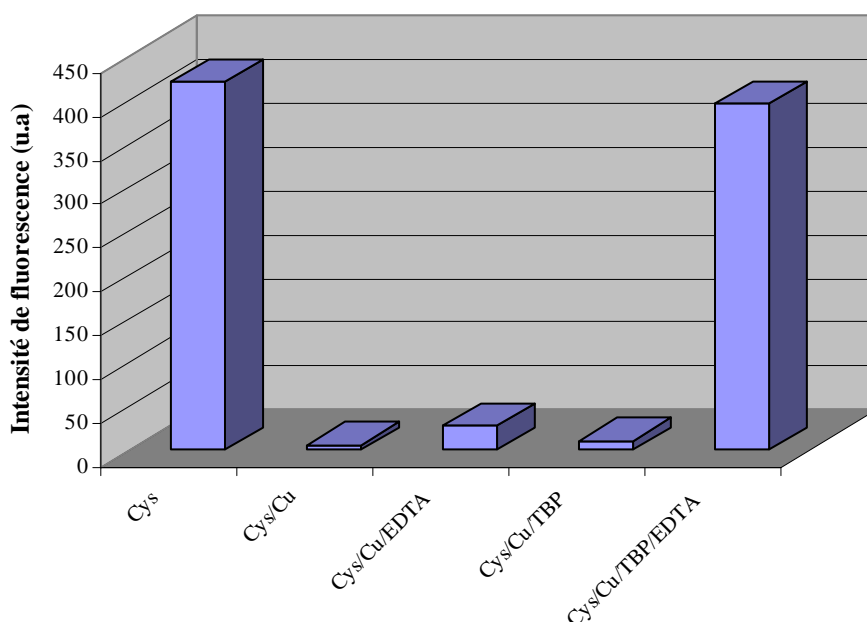
**Figure 59:** Effet du cuivre ( $10 \text{ mg.L}^{-1}$ ) sur la détection de la cystéine ( $2 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) à  $\lambda_{\text{em}} = 445 \text{ nm}$  ( $\lambda_{\text{ex}} = 335 \text{ nm}$ ),  $\text{pH} = 9.5$ ,  $[\text{OPA}] = 50 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ ,  $[\text{AE}] = 13,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ ,  $\text{MeOH} = 43\%$ ,  $[\text{EDTA}] = 0,1 \text{ mol.L}^{-1}$

Comme nous avons pu le constater, même en présence d'un agent chélateur, les métaux ont une influence inhibitrice sur la dérivation des thiols, affectant ainsi leur quantification. Ce comportement est dû à la forte affinité des thiols avec les métaux, particulièrement ceux de transition (Vairavamurthy *et al.*, 2000 ; Dryden *et al.*, 2007 ; Kramer *et al.*, 2007). A titre d'exemple, la cystéine présente des constantes de stabilité de 16,4, 18,8, 31,2 et 44,0 respectivement pour le cobalt(II), le nickel(II), le fer(III) et le mercure(II) (Ringbom, 1967).

Afin d'éliminer cette interférence et permettre la quantification des thiols liés aux métaux, divers essais (résines échangeuses d'ions, résines chélatantes) ont été effectués pour casser la liaison thiol-métal. Ces tentatives n'ont pas permis de piéger les métaux et empêcher leurs interférences. C'est pourquoi, plutôt que de « jouer » sur la complexation sélective, ou sur le piégeage des métaux sur résines, nous avons opté pour l'ajout au mélange réactionnel d'un agent réducteur ; le TBP a été choisi du fait de son utilisation pour la détermination des thiols totaux,

Les tests ont été effectués en présence de  $10 \text{ mg.L}^{-1}$  de cuivre et de  $2 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$  de cystéine. Dans un premier temps, on a utilisé le TBP dans les concentrations optimisées antérieurement, afin de séparer le cuivre du thiol, mais comme on peut l'observer dans la figure 60, cet ajout seul ne permet pas d'éliminer l'interférence du cuivre. En effet, après l'ajout de TBP, le cuivre se trouve libéré du

groupement thiol, mais soit cette libération n'est que transitoire, soit le cuivre libre provoque un « quenching » de fluorescence de l'isoindole formé. C'est pourquoi il faut également ajouter de l'EDTA afin de complexer le cuivre et ainsi permettre une détection de la cystéine.



**Figure 60 : Réduction du complexe Cuivre-thiol à :  $\lambda_{em}$  = 445 nm ( $\lambda_{ex}$  = 335 nm), pH (réduction) = 8,2, [TBP] = 200 mmol.L<sup>-1</sup>, [EDTA] = 0,1 mol.L<sup>-1</sup>, pH (dérivation) = 9.5, [OPA] = 50  $\mu$ mol.L<sup>-1</sup>, [AE] = 13,5 mmol.L<sup>-1</sup>, MeOH = 43%.**

L'ajout du TBP permet de briser la liaison du complexe Cu-thiol et l'EDTA permet à son tour de complexer le cuivre libéré lors de la réduction. Nous avons fait des essais sur les autres métaux analysés et nous avons pu détecter jusqu'à 90% des thiols initialement complexés aux métaux, comme le montre le tableau 20.

**Tableau 20: Effets de différents éléments sur la fluorescence du dérivé isoindole en présence et sans présence du TBP et EDTA.  $\lambda_{em}$ = 445 nm ( $\lambda_{ex}$ = 335 nm), pH (réduction)= 8,2, [TBP]= 200 mmol.L<sup>-1</sup>, [EDTA]= 0,1 mol.L<sup>-1</sup>, pH (dérivation)= 9.5, [OPA]= 50  $\mu$ mol.L<sup>-1</sup>, [AE]= 13,5 mmol.L<sup>-1</sup>, MeOH= 43%.**

	Concentration [mg.L <sup>-1</sup> ]	%IF sans TBP	%IF avec TBP et avec EDTA
Cystéine (2 $\mu$ M)	0	100	100
Al <sup>3+</sup>	2	100	97,6
Se(IV)	1	96,4	95,8
Fe <sup>3+</sup>	5	56,0	90,6
Fe <sup>2+</sup>	1	23,1	94,6
Cu <sup>2+</sup>	10	1,8	92,9
Mn <sup>2+</sup>	10	64,3	97,6
Zn <sup>2+</sup>	10	11,9	94,1
Co <sup>2+</sup>	0,5	3,8	61,2
Ni <sup>2+</sup>	0,5	13,3	94,1
Cd <sup>2+</sup>	0,5	13,8	98,8
Mg <sup>2+</sup>	25	99,0	100
Ca <sup>2+</sup>	100	99,8	101,2
Na <sup>+</sup>	100	95,5	101,2
K <sup>+</sup>	100	94,0	101,2
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	1	96,0	96,9
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	1	92,9	91,8
CO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	10	89,3	94,6
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	5	89,3	96,5
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	50	94,0	98,8
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	250	96,4	100
Cl <sup>-</sup>	200	96,4	97,9

Tous les interférents testés sont fréquemment rencontrés dans l'environnement. L'utilisation de l'EDTA dans le milieu réactionnel nous a permis de prévenir les effets d'interférence des ions métalliques complexant, permettant, donc la prévention des effets de quenching. Les conditions opératoires utilisés afin d'éviter tel interférence sont donc : pH (réduction)= 8,2, [TBP]= 200 mmol.L<sup>-1</sup>, [EDTA]= 0,1 mol.L<sup>-1</sup>, pH (dérivation)= 9.5, [OPA]= 50  $\mu$ mol.L<sup>-1</sup>, [AE]= 13,5 mmol.L<sup>-1</sup>, MeOH= 43%,  $\lambda_{em}$ = 445nm ( $\lambda_{ex}$ = 335nm).

### III.2.3. Validation de la méthode

#### III.2.3.1. Thiols réduits

Afin de valider cette méthode, nous avons effectué l'analyse des thiols par la méthode d'Ellman (méthode standard pour détection de thiols non oxydés (Ko *et al.*, 2007 ; Tamas *et al.*, 2008)) afin de comparer les résultats sur des échantillons réels avec l'analyse par fluorescence en microplaques.

La détection de groupements sulfhydryles par la méthode d'Ellman a été faite selon les instructions de la procédure de la méthode de référence. D'après cette procédure les solutions ont été préparées de la façon suivante :

Tampon de réaction : Phosphate de Sodium  $0.1 \text{ mol.L}^{-1}$  à pH 8,0, avec  $1 \text{ mmol.L}^{-1}$  EDTA.

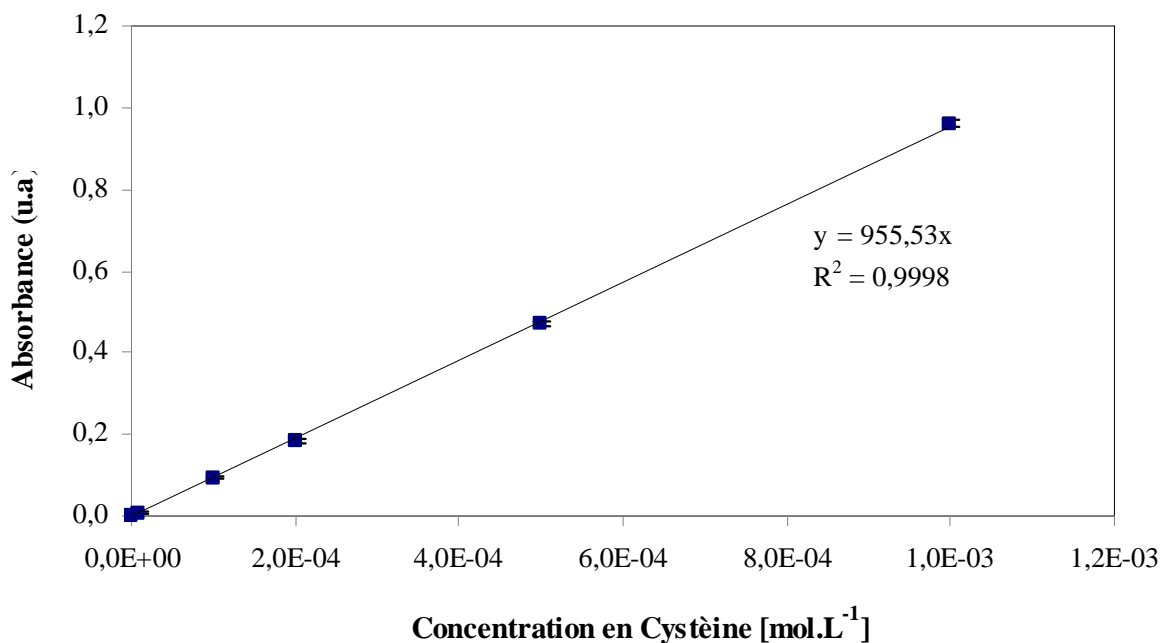
Solution Ellman : 4mg du réactif d'Ellman dans 1ml du tampon de réaction. Afin de mesurer l'absorbance du produit formé, on a ajouté dans une cuve en quartz des solutions contenant:

50 $\mu\text{L}$  Solution Ellman ; 2,5ml Tampon phosphate ; 250 $\mu\text{L}$  Echantillon. Après agitation et au bout de 15 minutes, l'absorbance est mesurée à 412 nm.

Les caractéristiques analytiques de cette méthode de référence ont été établies à partir d'une solution mère étalon de cystéine à  $1 \text{ mmol.L}^{-1}$  préparée dans HCl  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  (Tableau 21). Cette solution a été diluée avec HCl  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  successivement pour obtenir 6 points de calibration afin d'établir la courbe d'étalonnage (Figure 61), trois réplicats de chaque étalon ayant été effectués.

**Tableau 21 : Caractéristiques analytiques de la méthode Ellman**

Domaine de linéarité ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ )	2,82 – 100
Limite de détection ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ )	2,82
Limite de quantification ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ )	9,39
Coefficient de corrélation ( $R^2$ )	0,9998



**Figure 61: Courbe d'étalonnage de la cystéine avec la méthode d'Ellman**

#### III.2.3.1.1. Echantillons de sols et composts.

La validation a dans un premier temps été réalisée sur des extraits aqueux de sols et de composts. Les extraits aqueux ont été obtenus à partir de 20 g d'échantillon sec mélangés avec 40 ml d'eau ultra pure. Ce mélange a été agité en batch pendant 15 minutes à température ambiante. Suite à une période de repos de 10 minutes, la solution a été centrifugée à 12000 rpm pendant 10 minutes. Le surnageant a été filtré et recueilli dans un flacon en verre brun pour analyse avec les deux méthodes.

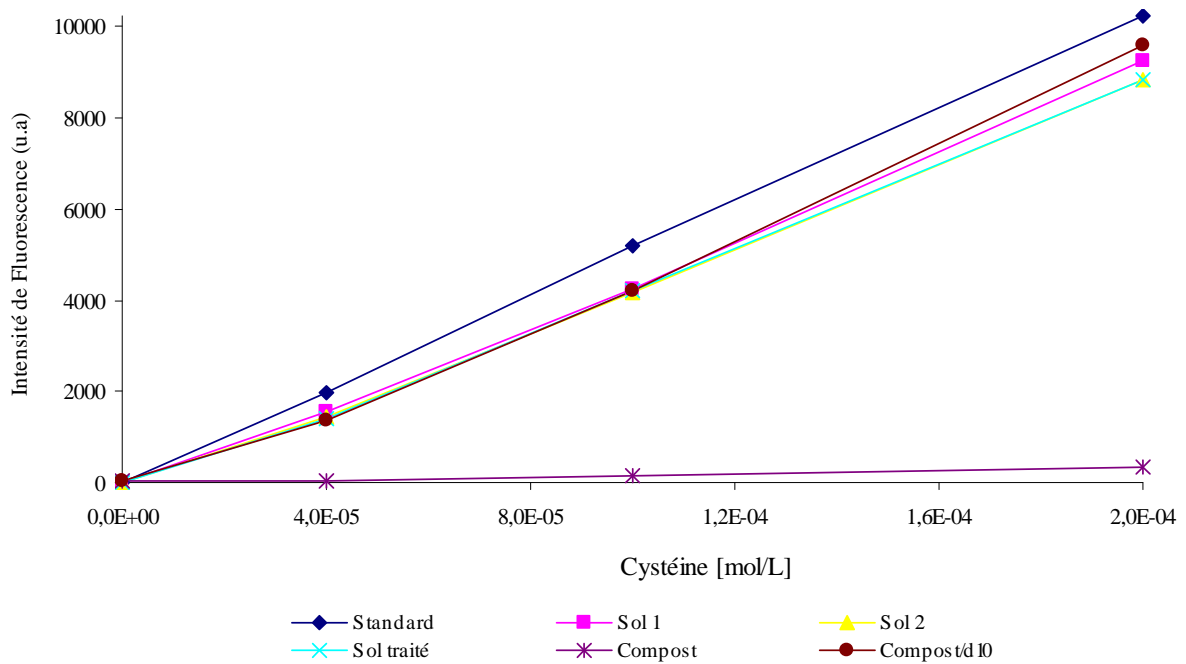
Les premiers tests effectués sur les échantillons de sols ont donné des concentrations inférieures à la limite de détection (Tableau 22). Afin de valider les méthodes et de s'affranchir des interférences potentielles de la matrice, la méthode des ajouts dosés a été appliquée.

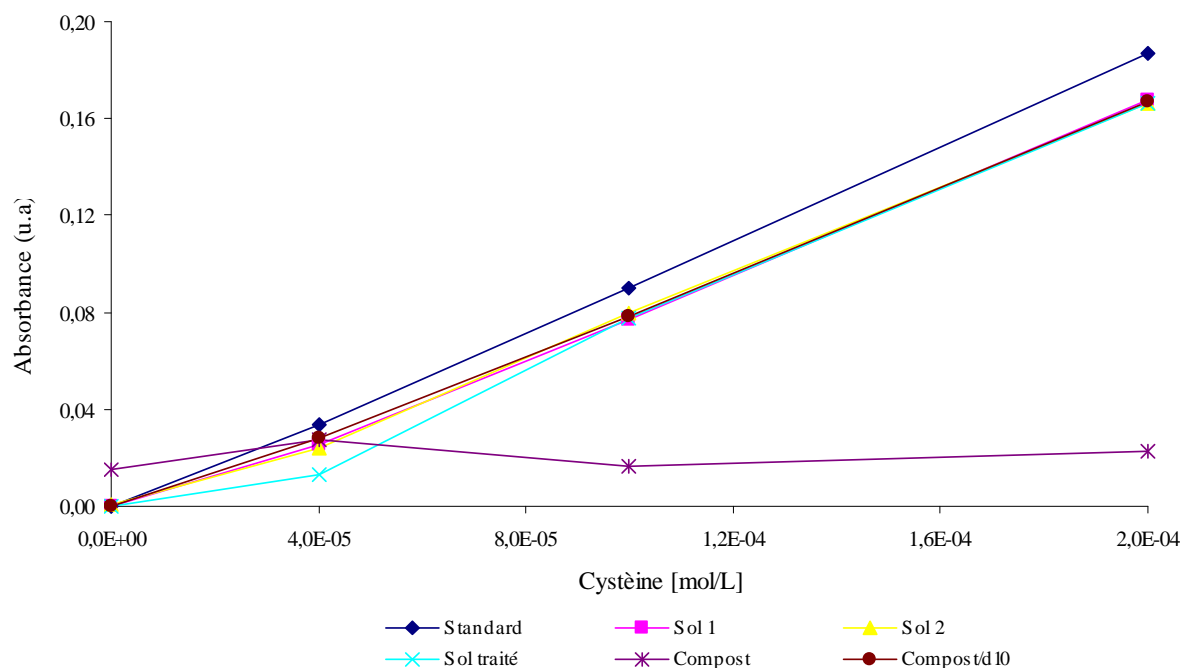
Pour chaque échantillon, on a fait des ajouts dosés de standards de cystéine ( $40 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ,  $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$  et  $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ). Par prolongation de la droite d'étalonnage ainsi obtenue, et par lecture de la valeur prise par l'abscisse lorsque l'ordonnée est nulle, on peut déterminer la concentration des thiols dans l'échantillon initial.



**Tableau 22 : Comparaison des méthodes de détection des thiols**

Echantillons	Concentration en thiols ( $\mu\text{mol/L}$ )	
	Méthode d'Ellman	Méthode Développée
Sol 1	< LD	< LD
Sol 2	< LD	< LD
Sol Traité	< LD	< LD
Compost	< LD	0,43
Compost/d10	16,4	1,08

**Figure 62: Méthode des ajouts dosés appliquées aux échantillons de sols et compost (OPA-AE)**



**Figure 63 : Méthode des ajouts dosés appliquée aux échantillons de sols et compost (Ellman).**

Nous observons dans les figures 61 et 62 que les résultats des ajouts dosés effectués sur l'échantillon de compost ne traduisent pas une bonne linéarité pour les deux méthodes. Cette interférence peut être due à la forte coloration de l'échantillon, puisque après d'une dilution de l'échantillon par 10 (Compost/d10) on obtient une bonne linéarité.

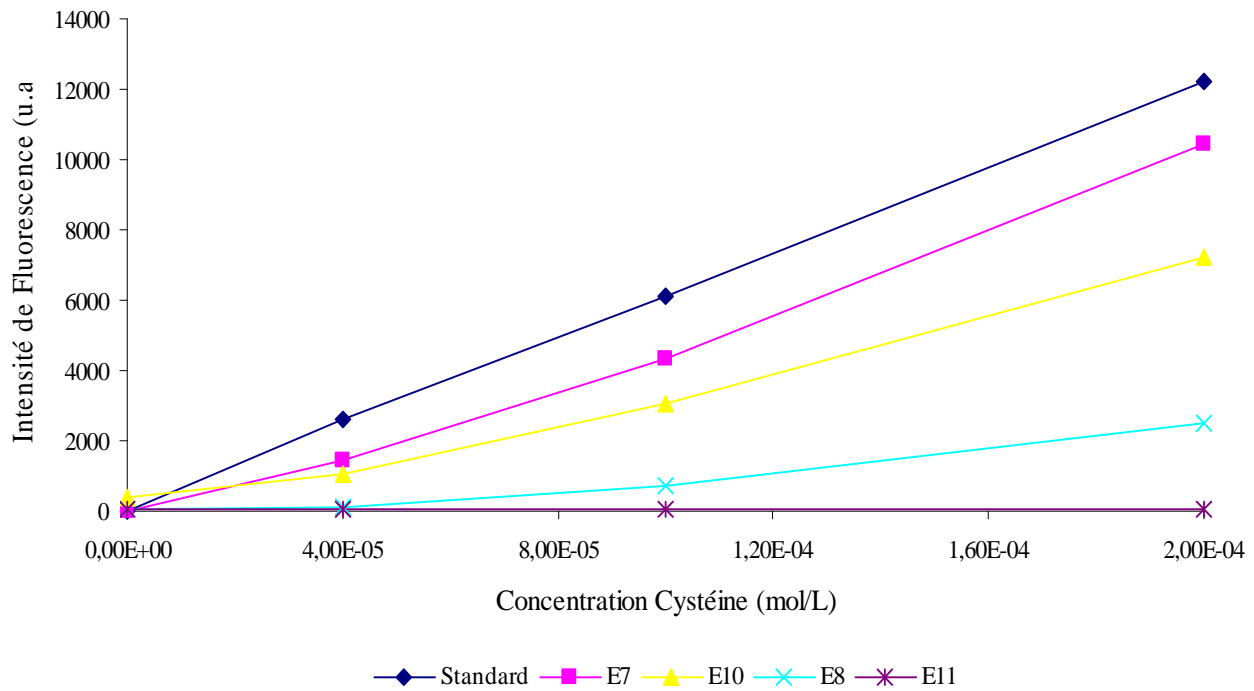
Pour les échantillons de sols, les droites obtenues sont linéaires dans les deux méthodes, par contre on observe que la méthode OPA-AE développée a permis de quantifier des concentrations plus faibles que la méthode Ellman de référence.

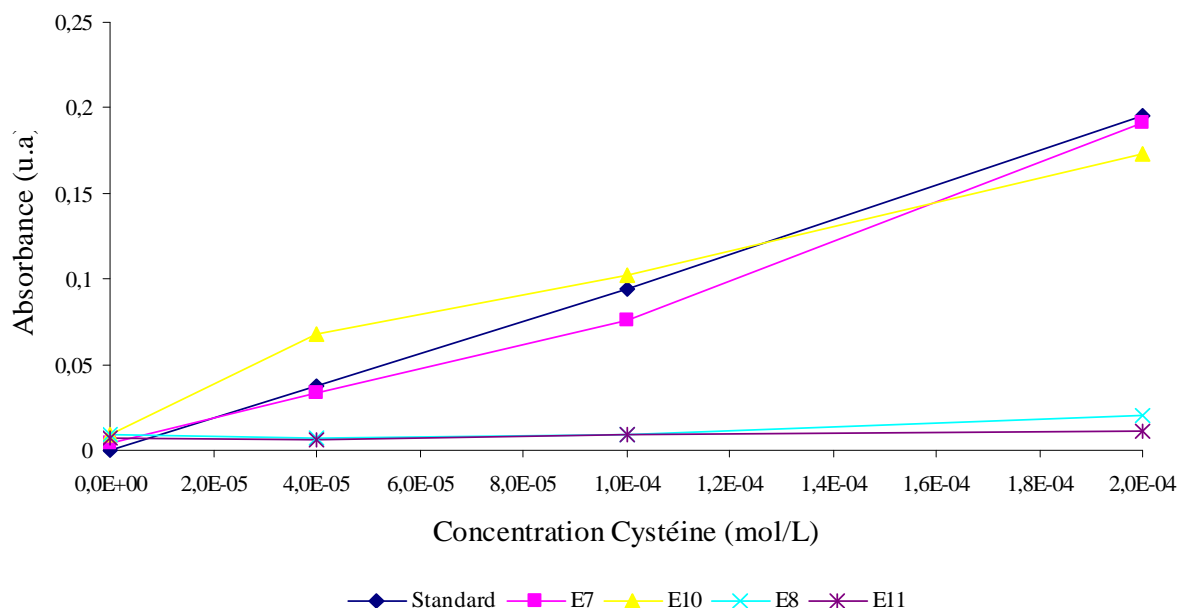
#### *III.2.3.1.2. Echantillons de station d'épuration.*

La validation de la méthode OPA-AE développée a ensuite été poursuivie sur des boues de station d'épuration provenant d'une station d'épuration de traitement des boues de Marseille, (France) recueillis à différentes étapes de la digestion anaérobie. Les échantillons de boues ont été centrifugés à 12000 rpm et filtrés sur un filtre en polyéther sulfone (PES) de 0,8  $\mu$ m de porosité.

**Tableau 23: Comparaison des méthodes de détection de thiols**

Echantillons	Concentration en thiols ( $\mu\text{mol/L}$ )	
	Méthode d'Ellman	Méthode Développée
Epaississeur (E7)	< LD	1,25
Epaississeur (E10)	12,0	12,20
Fermenteur (E8)	< LD	1,97
Fermenteur (E11)	< LD	1,19

**Figure 64: Méthode des ajouts dosés appliquée aux échantillons de boues de station d'épuration (OPA-AE)**



**Figure 65 : Méthode des ajouts dosés appliquées aux échantillons de boues de station d'épuration (Ellman).**

Les figures 64 et 65 montrent les résultats des ajouts dosés effectués sur des échantillons de boues. On peut observer que, comme dans le cas du sol et du compost, notre méthode permet de détecter des concentrations plus faibles que la méthode de référence (Tableau 23), mais que les deux méthodes présentent des interférences dues à la coloration de l'échantillon, donc des dilutions seront aussi nécessaires pour ces types d'échantillons s'ils sont très colorés.

### III.2.3.2. Thiols oxydés

Il n'existe pas d'échantillons certifiés de thiols oxydés. C'est pourquoi, nous avons validé notre méthode à partir d'échantillons réels en y ajoutant des quantités connues de CSSC, afin de vérifier si les substances naturelles présentes dans ces échantillons peuvent interférer (augmentation ou quenching de fluorescence) avec la procédure proposée de détection de thiols totaux. Ainsi, des volumes connus de solutions standards de CSSC ( $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) ont été ajoutés à des solutions de sols, de composts, de boues de station d'épuration et plantes (tige, racine, feuille). Les résultats obtenus et présentés dans le tableau 24 montrent que la quantité de cystine ajoutée dans les échantillons testés est bien quantifiée dans la plupart des échantillons. Pour les échantillons dont le pourcentage de cystine détecté est inférieur à 95%, des dilutions sont nécessaires afin de permettre une diminution de la coloration de l'échantillon.

**Tableau 24: Validation par ajouts dosés de la procédure pour la détection de thiols totaux**

Echantillon	Avant l'addition de Cystine	Après l'addition 20µM Cystine	Différence (µM)	% Cystine détecté
Sol 1	0,73	42,80	42,07	105
Sol 2	0,18	42,00	41,82	105
Sol Traité	1,94	44,10	42,16	105
Compost d/10	12,70	45,70	33,00	83
Épaississeur 1	2,85	45,10	42,25	106
Épaississeur 2	9,69	41,80	32,11	80
Tige Bambou	29,30	69,60	40,30	101
Feuille Bambou	43,80	83,00	39,20	98
Racine Bambou	18,00	56,30	38,30	96
Foin	29,10	57,20	28,10	70
Foin d/100	0,75	41,10	40,35	101
<b>Moyenne</b>	<b>13,50</b>	<b>51,70</b>	<b>38,20</b>	<b>95</b>

### III.2.4. Conclusion

Malgré les interférences dues à la coloration des échantillons, le protocole mis au point pour la détermination des thiols réduits par mesure en microplaques a permis d'obtenir de meilleurs résultats au niveau de la sensibilité par rapport à la méthode de référence (Ellman). En effet, la méthode proposée est 300 fois plus sensible que la méthode standard. D'autre part, notre méthode permet aussi la détection des thiols oxydés (ponts disulfures et thiols complexés aux métaux). Ceci est un avantage complémentaire si on tient compte que la méthode Ellman permet uniquement la quantification des thiols réduits.

### III.3. Détermination des acides gras volatils par automatisation en flux avec détection par fluorescence

#### III.3.1. Analyse en microplaque

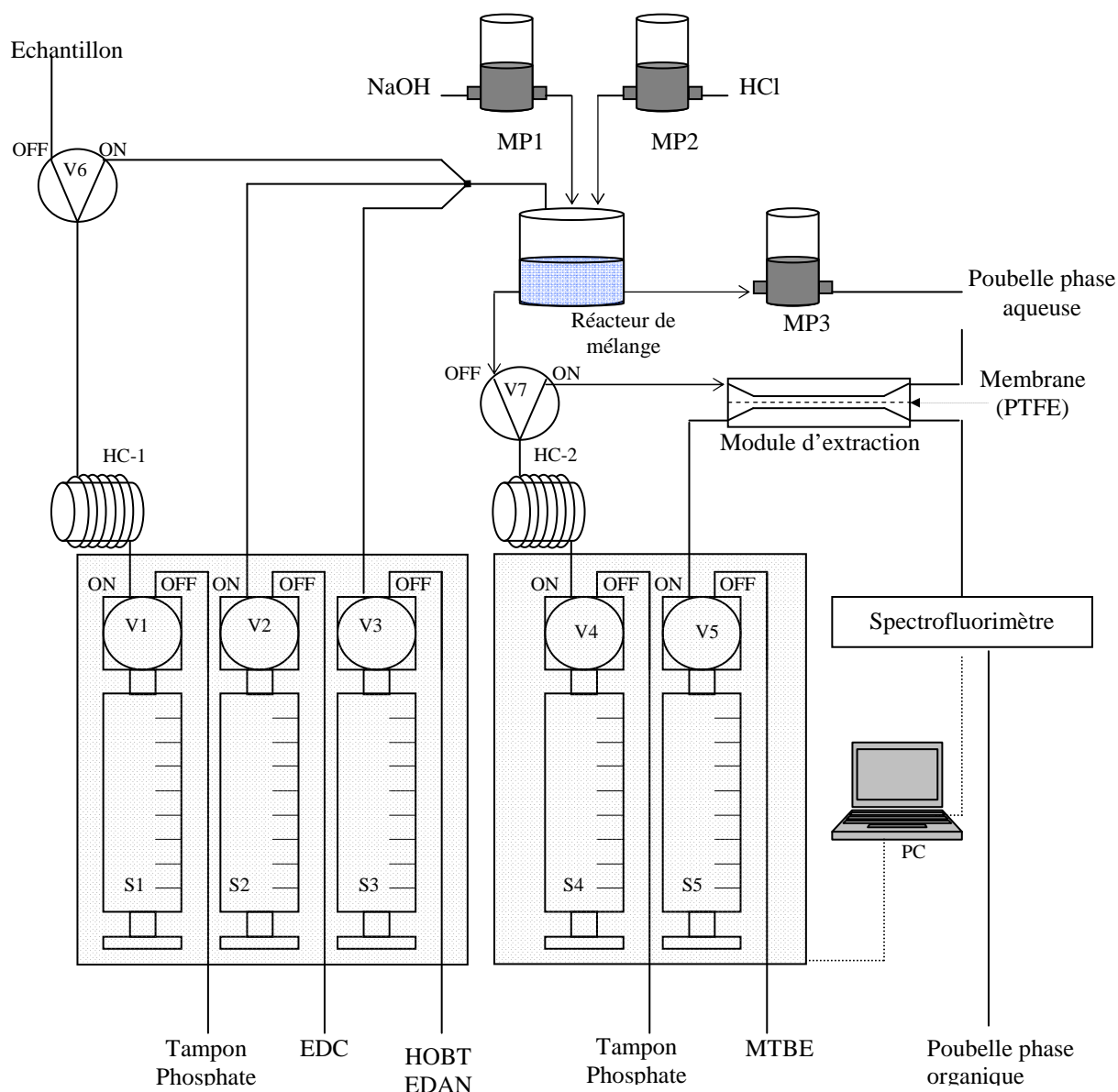
L'analyse multi-échantillons pour la détermination des acides gras volatils (AGV) par microplaque de 96 puits a été développée par l'équipe de Chimie de l'Environnement Continental de l'Université de Provence. Cette méthode est simple, précise et présente une procédure similaire à celle qui a été mise en œuvre et décrite par Robert-Peillard *et al.* (2009). La méthode précédente utilise un réactif d'activation de la fonction carboxylique (carbodiimide soluble dans l'eau, EDC) et un réactif aminé de dérivation fluorescent (N-(1-naphtyl) éthylènediamine, EDAN). La séparation du dérivé-AGV fluorescent et du réactif fluorescent a été modifiée afin d'être appliquée au format microplaque. La nouvelle procédure utilise l'O-phthaldialdéhyde (OPA) afin de faire un quenching de fluorescence de l'EDAN. Cette procédure a un pH optimal de 7 et s'effectue au sein du lecteur de microplaques à une température proche de 40°C. Cette procédure, une fois optimisée, a été appliquée à divers acides carboxyliques et à d'autres composés organiques, ce qui a permis de montrer que les AGV présentent les réponses de fluorescence les plus élevées avec des résultats homogènes pour les principaux AGV (acide acétique, propionique, butyrique et valérique). Après application à des échantillons réels (boues issues de stations d'épuration ou issues d'usines de méthanisation des déchets d'ordures ménagères), la comparaison des résultats obtenus par notre méthode alternative avec ceux obtenus par la méthode de référence (chromatographie en phase gazeuse et détection par ionisation de flamme) a montré que les deux méthodes étaient équivalentes en termes de résultats et de précision. Ceci démontre le grand potentiel de notre méthode d'analyse des acides gras volatils en microplaques. Les détails de cette méthode analytique sont présentés dans une publication soumise au journal *Analytical Chemistry* en septembre 2010.

#### III.3.2. Analyse en Flux

##### III.3.2.1. Automate développé

Le protocole adopté pour la réalisation de notre automate de détermination des concentrations en AGV, est basé sur une technique combinée MSFIA-MPSF ; celle-ci a été retenue du fait de sa robustesse et de sa versatilité. La méthode analytique utilisée dans cette analyse en flux est inspirée

du protocole alternatif développé par Robert-Peillard *et al.* (2009). Le montage utilisé pour l'analyse en flux est présenté dans la figure 66.



**Figure 66 : Représentation schématique du système d'analyse en flux pour la détection des acide gras volatils (MP : Multipompes, HC: Boucle d'attente, S : Seringues, V : Valves de commutation)**

La procédure automatisée pour la détermination en ligne des AGV est représentée dans le tableau 25 et peut se résumer de la façon suivante :

Étape d'activation : Dans cette première étape, l'échantillon (400µl) est aspiré dans la boucle d'attente (HC-1) par la seringue S1, après l'activation de la vanne V6, tandis que les deux autres seringues (S2-S3) sont remplies des solutions d'EDC et HOBT / EDAN. L'échantillon, l'EDC

(50  $\mu$ l) et la solution mixte d'HOBt/EDAN (900  $\mu$ l) sont ensuite injectés simultanément avec un débit de 15 ml/min dans le réacteur de mélange. L'attente de réactifs et l'échantillon dans ce réacteur est de 120 secondes.

- Étape d'amidation : Dans cette deuxième étape, 70  $\mu$ L de NaOH à 1 mol.L<sup>-1</sup> sont injectés à 2,3 ml/min par la micropompe 1 (MP1) dans le réacteur de mélange, afin d'augmenter le pH à 8 ; ce pH permet d'assurer la formation de l'amide fluorescente (dérivé fluorescent) produite par la réaction entre le produit intermédiaire activé et l'amine fluorescente EDAN.

- Étape d'acidification : Après 30 secondes d'attente, la micropompe 2 (MP2) injecte 80 $\mu$ L d'HCl à 1 mol.L<sup>-1</sup> à 2,3 ml/min dans le réacteur afin d'atteindre un pH de 2,5 ; ce pH permet d'assurer une séparation optimale entre l'amine initiale (EDAN) et l'amide formée, durant l'étape d'extraction liquide-liquide réalisée dans l'étape suivante.

- Étape d'extraction : Au cours de cette étape, le mélange échantillon - réactifs est aspiré dans la deuxième boucle d'attente (HC-2) par la seringue 4 (S4). Après l'activation de la valve 7 (V7), le mélange réactionnel et le solvant d'extraction (MTBE) sont injectés simultanément par des seringues (S4 et S5) dans la cellule d'extraction. Cette cellule est dotée d'une membrane PTFE permettant de séparer les phases organique et aqueuse.

- Étape de rinçage du réacteur de mélange : Cette étape est effectuée parallèlement à l'étape d'extraction. En effet, au moment de l'aspiration du mélange réactionnel vers HC-2, la seringue 2 (S2) injecte 1ml du liquide vecteur (tampon phosphate) afin de nettoyer le réacteur de mélange.

- Étape de rinçage de la cellule d'extraction : Suite à la séparation de phases par la membrane dans la cellule d'extraction, le dérivé fluorescent désiré reste dans la phase organique, et est dirigé vers le détecteur de fluorescence; la phase aqueuse est orientée vers les déchets. Après l'enregistrement des données intensité de fluorescence à 335 nm et 395 nm, respectivement pour les longueurs d'onde d'émission et d'excitation, le liquide vecteur et le MTBE sont injectés afin de nettoyer la cellule d'extraction. Enfin, la micropompe 3 (MP3) est activée pour vider le réacteur de mélange, avant de commencer un nouveau cycle d'analyse.



Tableau 25 : Procédure automatisée de détermination des acides gras volatils

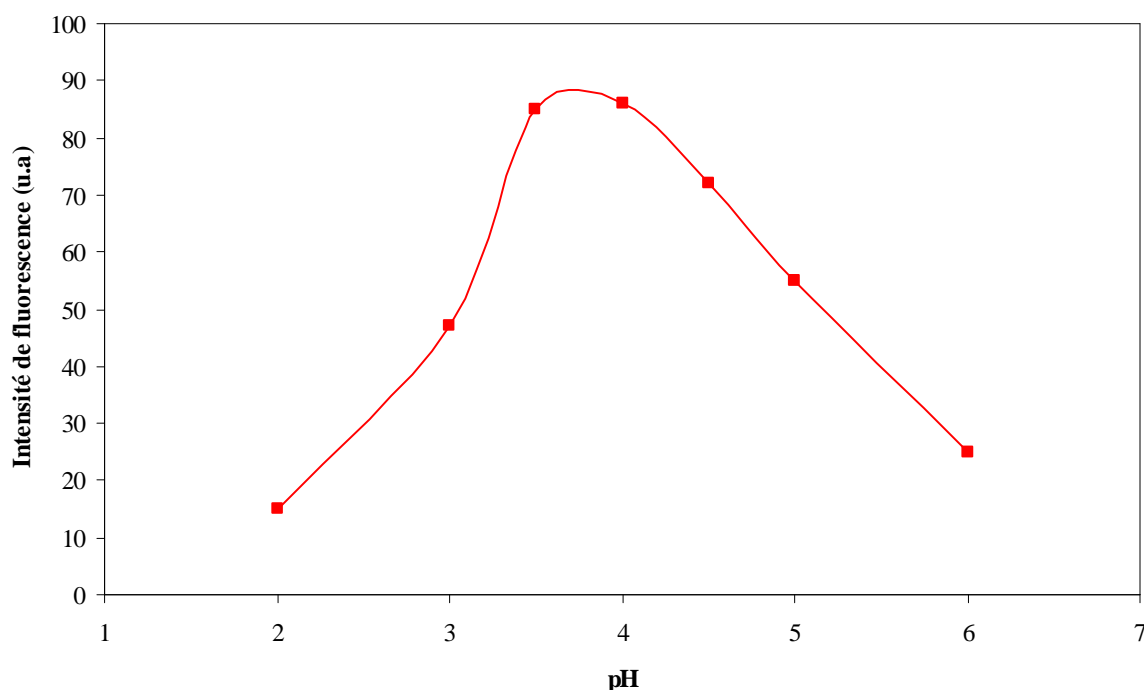
Etape	Mode	Position des valves							Position des micropompes			VOLUME injecté	Débit
		V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	MP1	MP2	MP3	ml	ml min <sup>-1</sup>
Activation	Dispense	Off	Off	Off	Off	Off	Off	Off	Off	Off	Off	0.4	15
	Aspire	On	Off	Off	Off	Off	Off	Off	Off	Off	Off	0.4	15
	Dispense	On	Off	On	Off	Off	On	Off	Off	Off	Off	0.4	15
	Dispense	Off	On	On	Off	Off	Off	Off	Off	Off	Off	0.1	15
	Dispense	Off	Off	On	Off	Off	Off	Off	Off	Off	Off	0.4	15
	Aspire	Off	Off	Off	Off	Off	Off	Off	Off	Off	Off	0.9	15
	Attente	120 Seconds											
Amidation	Dispense	Off	Off	Off	Off	Off	Off	Off	On	Off	Off	0.07	2.3
	Attente	30 Seconds											
Acidification	Dispense	Off	Off	Off	Off	Off	Off	Off	Off	On	Off	0.08	2.3
	Dispense	Off	Off	Off	Off	Off	Off	Off	Off	Off	Off	1.2	15
	Aspire	Off	Off	Off	On	Off	Off	Off	Off	Off	Off	1.0	15
Rinçage du réacteur de mélange	Dispense	On	Off	Off	Off	Off	On	Off	Off	Off	Off	0.5	15
	Aspire	Off	Off	Off	Off	Off	Off	Off	Off	Off	On	0.6	2.3
	Dispense	On	Off	Off	Off	Off	On	Off	Off	Off	Off	1.0	15
	Aspire	Off	Off	Off	On	Off	Off	Off	Off	Off	Off	0.2	15
Extraction	Dispense	Off	Off	Off	On	On	Off	On	Off	Off	Off	3.5	2.0
Rinçage de la cellule d'extraction	Dispense	Off	Off	Off	On	On	Off	On	Off	Off	Off	1.5	5.5
	Aspire	Off	Off	Off	Off	Off	Off	Off	Off	Off	On	1.0	2.3
	Aspire	Off	Off	Off	Off	Off	Off	Off	Off	Off	Off	5.0	15

### III.3.2.2. Présentation et optimisation des paramètres influençant la dérivation en flux des acides gras volatils

La dérivation des acides gras volatils par notre système en flux est influencée principalement par des facteurs tels que le pH d'activation et d'amidation ainsi que par le débit d'extraction. Afin d'obtenir le meilleur rendement de dérivation et d'extraction du dérivé, ces facteurs ont été optimisés.

#### III.3.2.2.1. Optimisation de l'étape d'activation

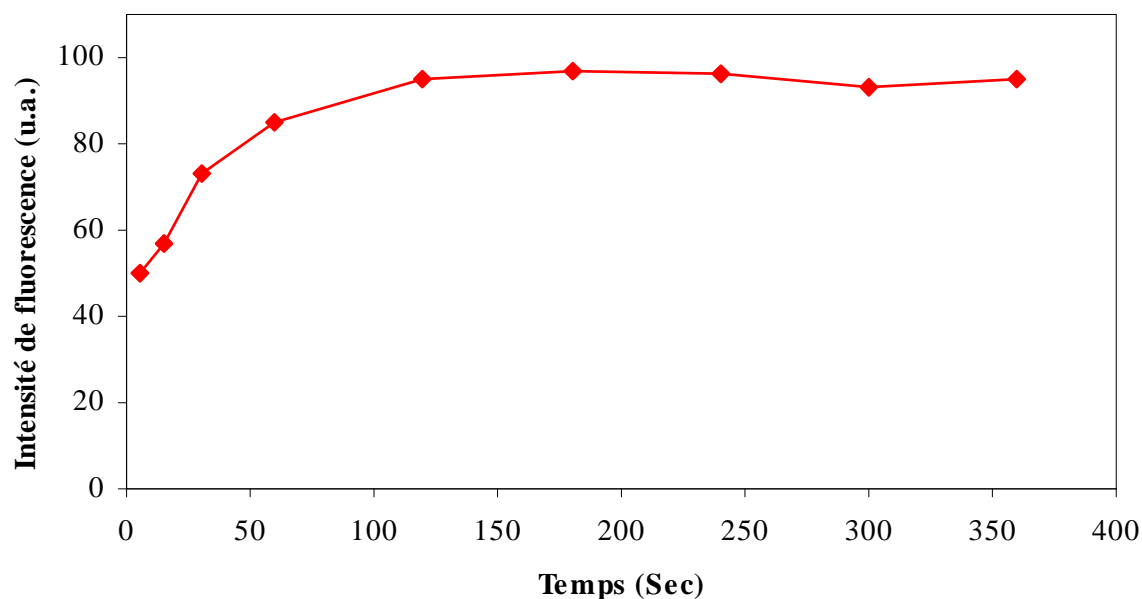
Comme on l'a vu précédemment (cf. Chapitre II), l'étape d'activation constitue la première partie de la procédure de dérivation des acides carboxyliques. L'optimisation de cette étape consiste principalement à étudier l'influence de la valeur du pH. Les différents essais de l'influence du pH sur la réaction de formation du produit intermédiaire ont été effectués en présence de l'EDC [60 g/L] (activateur primaire du carbone portant le groupement carboxylique, solubilisé dans l'éthanol) et de l'HOBT [3,3 g/L] (activateur secondaire du carbone porteur du groupement carboxylique).



**Figure 67:** Variation de l'intensité de fluorescence en fonction du pH dans l'étape d'activation

Les résultats obtenus et présentés sur la figure 67 montrent que la formation du produit intermédiaire, activé par des composés carbodiimides (EDC et HOBT), est dépendante du pH. En effet, on peut observer que l'intensité de fluorescence augmente dans un premier temps avec le pH jusqu'à obtenir une intensité maximale pour un pH compris entre 3,5 et 4. L'intensité de fluorescence décroît ensuite avec l'augmentation du pH. Une diminution ou une augmentation au-delà de cette gamme de pH conduira donc à la diminution de l'efficacité des agents activateurs. Afin d'optimiser l'étape d'activation du carbone porteur du groupement – OH des acides carboxyliques étudiés, le pH du milieu réactionnel de cette première étape sera donc fixé à 4.

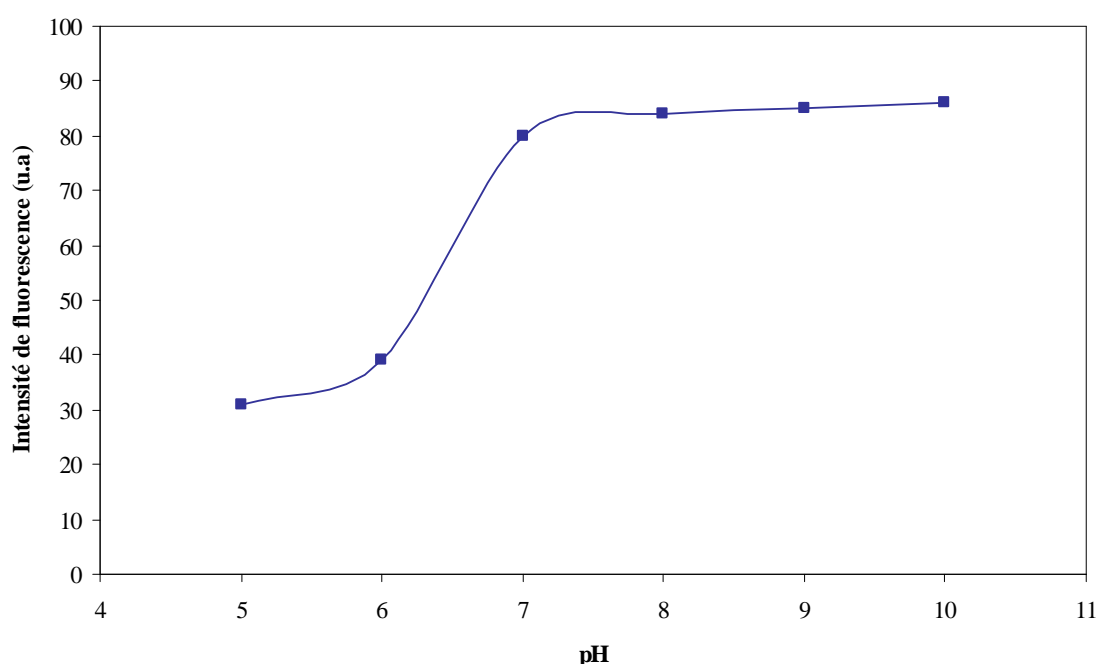
Une fois le pH choisi, une étude du temps d'activation a été effectuée. Le temps d'activation dans le système en flux a été varié entre 0 et 350 secondes. La figure 68 montre que l'intensité de fluorescence atteint un maximum au bout de 2 minutes, et que cette intensité reste stable au-delà. C'est donc ce temps de 120 secondes qui sera utilisé pour l'activation du carbone portant le groupement carboxylique.



**Figure 68: Optimisation du temps d'activation dans le système en flux.**

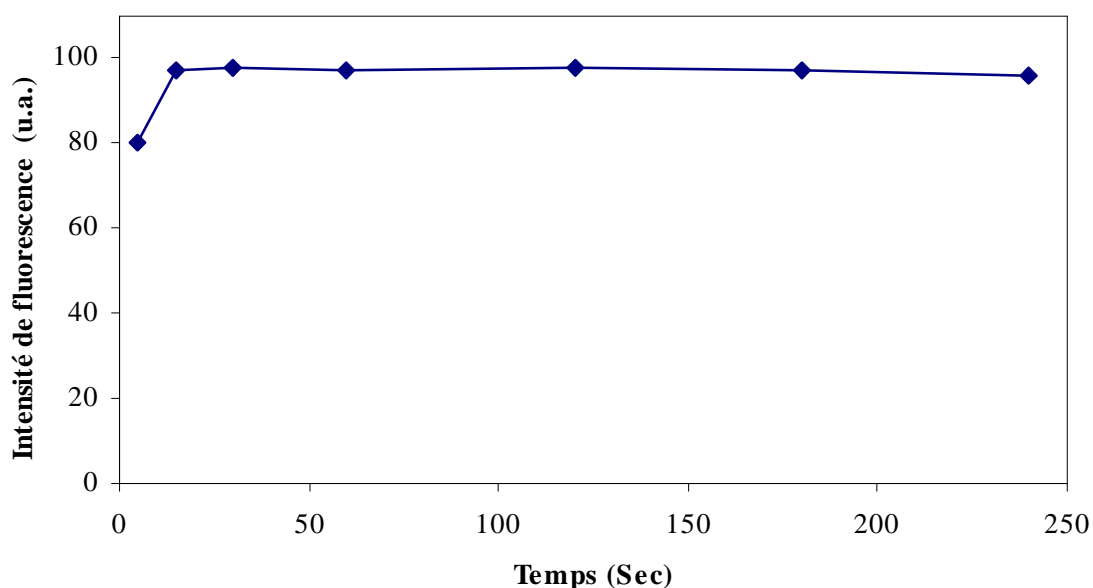
## III.3.2.2.2. Optimisation de l'étape d'amidation

Comme dans l'étape précédente, la réaction d'amidation est aussi fortement influencée par le pH. En effet, une étude effectuée en ajoutant des quantités croissantes de NaOH ( $1 \text{ mol.L}^{-1}$ ) à la solution réactionnelle contenant  $1,1 \text{ g.L}^{-1}$  d'EDAN a permis d'établir que la réaction d'amidation est beaucoup plus efficace lorsqu'elle est réalisée en milieu basique (Figure 69), C'est pourquoi, le pH de la réaction d'amidation est fixée à 8, valeur permettant d'obtenir un rendement d'amidation optimum.



**Figure 69: Optimisation du pH de l'étape d'amidation avec l'EDAN.**

Une fois le pH d'amidation établi, le temps nécessaire à la réaction d'amidation a été optimisé. Les résultats obtenus et représentés sur la figure 70 montrent que la cinétique d'amidation avec l'EDAN est très rapide, puisque la stabilité de cette étape est obtenue en 30 secondes à un pH de 8.



**Figure 70: Optimisation du temps de réaction de dérivation avec une solution standard de 10 mg.L<sup>-1</sup> d'acide acétique.**

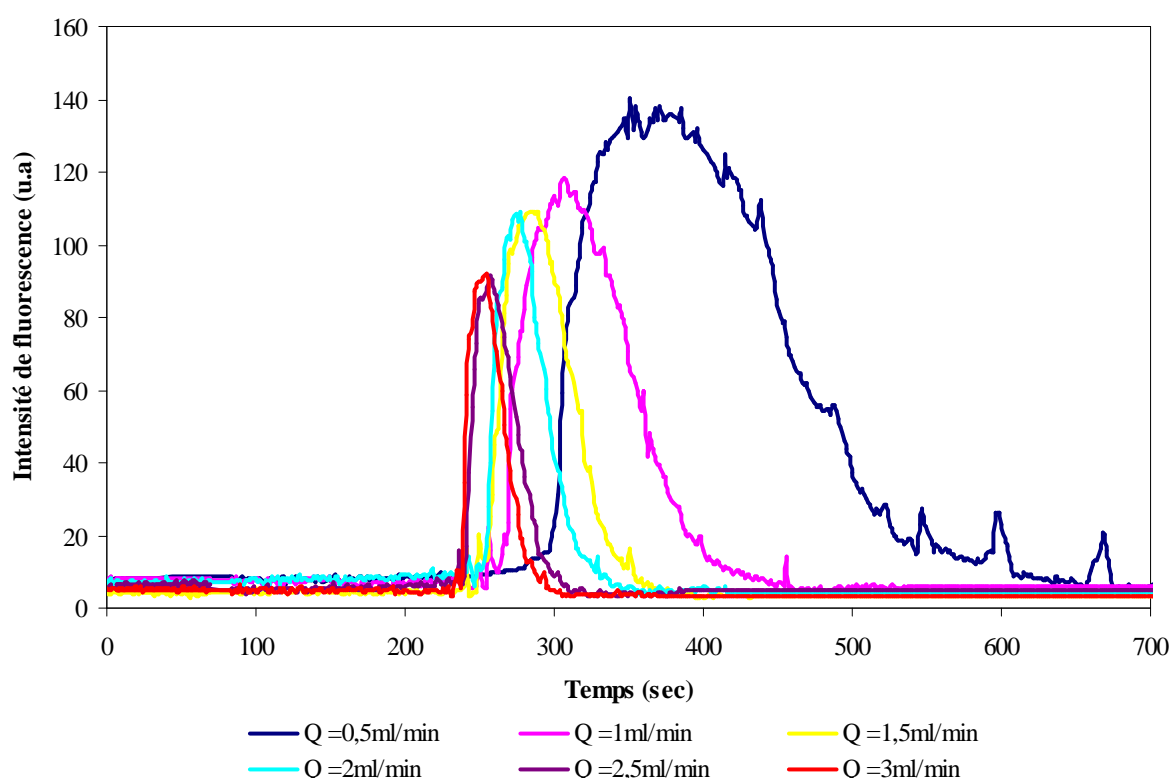
#### III.3.2.2.3. Optimisation de l'étape d'extraction

Comme déjà évoqué dans le chapitre précédent (cf. chapitre II), une étape d'extraction liquide-liquide du dérivé formé est nécessaire afin de s'affranchir des problèmes liés à l'inférence de l'autofluorescence produite par l'EDAN. Cette étape permet donc d'éliminer l'excès d'EDAN qui pourrait masquer la fluorescence du dérivé formé détecté à  $\lambda = 395\text{nm}$ .

#### III.3.2.2.4. Influence du débit d'extraction

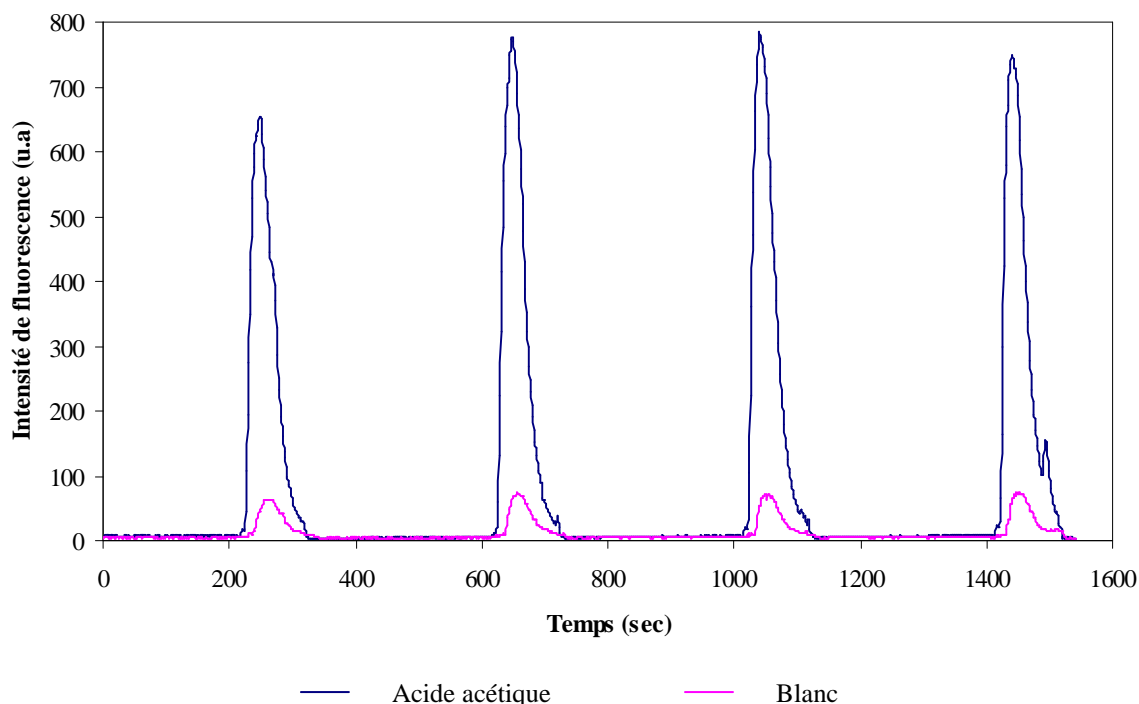
Dans notre système MSFIA-MPFS, le débit d'extraction du dérivé est aussi le débit de détection, puisque la poussée du mélange réactionnel, de la deuxième boucle d'attente (HC-2) vers la cellule de détection, est effectuée au fur et à mesure que le mélange réactionnel passe par la cellule d'extraction. Un débit d'extraction trop rapide induit des rendements d'extraction du dérivé faibles, des pics de fluorescences beaucoup plus minces et des intensités de fluorescence plus faibles ; or, l'ensemble de ces paramètres influent directement sur la sensibilité de la méthode.

Afin d'étudier l'influence de ce débit d'extraction sur la détection du dérivé et la cinétique de formation du dérivé, nous avons fait varier le débit de 0,5 à 3 ml/min. Comme le montre la figure 71, on obtient une stabilité du signal de fluorescence lorsque le débit de circulation est fixé aux alentours des 2 ml/min ; au-delà de 2 ml/min, l'intensité de fluorescence du dérivé diminue très peu. Choisir un débit plus faible que 2ml/min impliquerait une procédure de dérivation beaucoup plus longue, et des fluctuations d'intensité de fluorescence beaucoup plus importantes, c'est pourquoi le débit de 2 ml/min a été retenu : ce débit, permet d'atteindre une fréquence d'analyse de neuf échantillons par heure.



**Figure 71 : Influence du débit sur l'intensité de fluorescence et le temps d'extraction du dérivé amide formé**

La figure 72 présente un exemple de quatre répliquats obtenus pour la détection d'une solution d'acide acétique standard  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  avec les paramètres optimisés préalablement. Différents volumes d'échantillon ont été testés afin d'obtenir le meilleur compromis entre l'intensité de fluorescence du dérivé amidé formé et les réponses des pics. Un volume de  $400 \mu\text{l}$  d'échantillon a été retenu : il permet d'obtenir une bonne sensibilité et une bonne répétabilité des réponses pour la détection des acides gras volatils dans les échantillons testés.



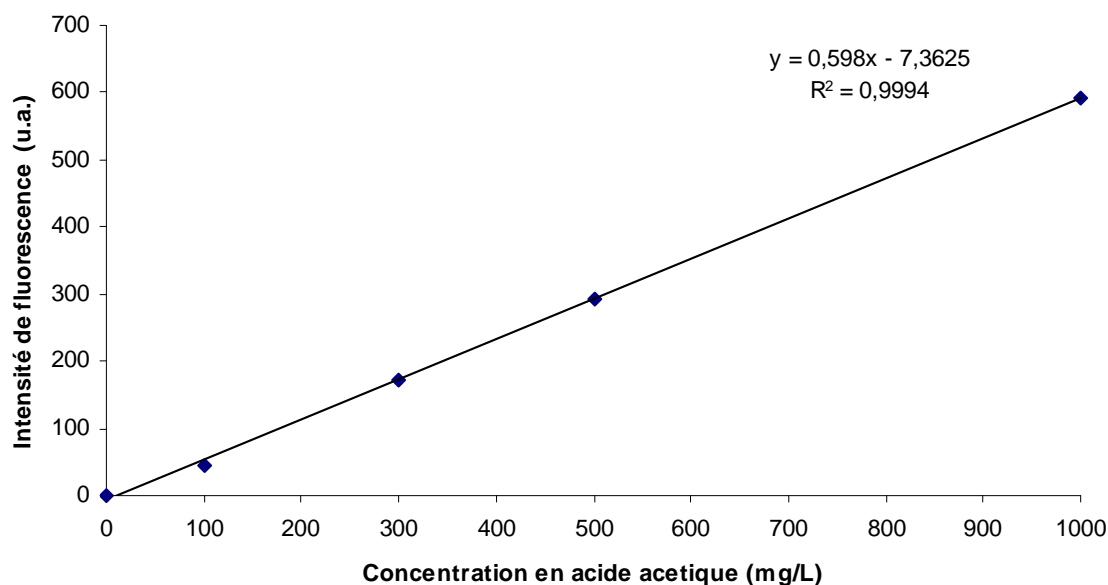
**Figure 72: Réponse du système d'analyse MSFIA-MPFS proposé avec 100mg/L d'acide acétique (volume de l'échantillon: 400  $\mu$ L ; temps d'activation : 120 sec ; temps d'amidation: 30 sec ; débit d'extraction: 2ml.min<sup>-1</sup>. ---- Blanc \_\_\_\_Acide acétique).**

### III.3.2.3. Caractéristiques analytiques

La courbe d'étalonnage a été tracée en utilisant des solutions d'acide acétique préparé à partir d'une solution standard de 1000 mg.L<sup>-1</sup>. L'acide acétique a été sélectionné comme composé de référence en raison de sa forte prédominance parmi les AGV durant l'étape d'acidogénèse, lors de la décomposition anaérobie de la matière organique (Hong *et al.*, 2009). C'est pourquoi par la suite, les intensités d'émission de fluorescence mesurées sur des échantillons réels ont été exprimées en équivalents - acide acétique.

La droite de régression (Figure 73) présente un domaine de linéarité qui s'étend jusqu'à 1000 mg.L<sup>-1</sup> avec un très bon coefficient de régression ( $R^2 = 0,9957$ ). Pour des concentrations plus élevées, l'intensité de fluorescence n'est plus proportionnelle à la concentration en AGV. La fonction d'étalonnage devient de type polynomiale. Il faut souligner que, par exemple dans les boues d'épuration municipales, les concentrations en AGV sont dans la gamme 30-800

mgL<sup>-1</sup> (Sosnowski *et al.*, 2008) ; la méthode développée peut donc être appliquée sans problèmes au suivi des AGV dans les usines de traitements des boues de station d'épuration.



**Figure 73: Corrélation entre l'intensité de fluorescence et les concentrations en acide acétique**

#### III.3.2.3.1. Limites de détection et limites de quantification

Les résultats obtenus pour les limites de détection, de quantification et la sensibilité ont été établis en utilisant les intensités de fluorescence obtenues avec une cellule en quartz, opérant en flux continu, avec un trajet optique de 1,5 mm et un volume interne de 25 µL. Les limites de détection ont été calculées sur 10 dosages de solution de concentration nulle en analyte.

La limite de détection établie est 5,1 mg.L<sup>-1</sup> et la limite de quantification de 19,1 mg.L<sup>-1</sup>. Cette limite de détection obtenue constitue donc la valeur basse de notre gamme d'application, ainsi les valeurs de concentrations obtenues par notre méthode de dosage pourront être considérées comme fiables lorsqu'elles seront supérieures ou égales à cette limite de quantification.

#### III.3.2.3.2. Sélectivité

La sélectivité de la méthode développée pour les acides gras volatils a tout d'abord été testée avec une sélection d'acides carboxyliques parmi des acides carboxyliques aliphatiques à



longue chaîne et acides carboxyliques aromatiques, composés les plus rencontrés dans les échantillons chargés en acides carboxyliques.

**Tableau 26 : Réponses de fluorescence de divers acides carboxyliques après dérivation**  
 (% Intensité de fluorescence = (Intensité de fluorescence de l'acide carboxylique cible / Intensité de fluorescence d'une solution d'acide acétique à 50mgL<sup>-1</sup>) × 100). Tous les acides carboxyliques ont été testés à une concentration de 50 mgL<sup>-1</sup>

Acide Carboxylique 50 mg/ml	% Intensité de fluorescence
Acétique	100
Propionique	104
Butyrique	114
Valérique	89
Succinique	28
Lactique	17
p-OH Benzoïque	9
Formique	5
Citrique	3
Fumarique	2
Tartrique	1
Oxalique	1
Coumarique	1
Pyruvique	1

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 26, et montrent que la méthode développée est spécifique des acides gras volatils, puisque seuls les acides acétique, propionique, butyrique et valérique réagissent avec un rendement important. Assez étonnamment, l'acide formique, qui n'est pas un acide gras volatil, mais qui est l'acide carboxylique le plus simple n'affiche que 6% de l'intensité de la fluorescence d'une solution d'acide acétique 50 mgL<sup>-1</sup>.

L'affinité des AGV (C2 - C5) peut être expliquée principalement par deux raisons. La première est basée sur la valeur du pH utilisée lors de l'étape d'activation du groupe carbonyle. En effet, à pH 4, la protonation de l'oxygène présent dans la fonction carbonyle est possible, en conséquence, les acides dont les valeurs de pKa sont autour de 4,8 (tels que l'acide acétique, propionique, butyrique, et valérique) vont mieux réagir avec les réactifs d'activation

que les acides ayant des valeurs de pKa inférieurs à 4 (tels que l'acide pyruvique (pKa 2,9); l'acide citrique (pKa 3,1); l'acide tartrique (pKa 3)).

La seconde raison est basée sur l'encombrement stérique. En effet, il est connu que les agents nucléophiles (EDAN dans notre cas) réagissent plus facilement avec les groupements carbonyles sans encombrement. Ce qui explique la faible réactivité des acides ramifiés tels que les acides malique, citrique, ellagique et coumarique, ainsi que les acides carboxyliques aromatiques.

Une étude réalisée par Iwasawa *et al.* (2003) avait d'ailleurs déjà permis d'établir que les acides carboxyliques sont particulièrement peu réactifs dans un environnement stériquement « encombré ». D'autre part, la chimiosélectivité des réactions d'amidation est fortement déterminée par les propriétés électroniques des groupements de substitutions situés en position  $\alpha$  du carbone porteur du groupement carboxylique (Tedder *et al.*, 1972). Ceci permet d'expliquer que la présence de groupements donneurs d'électrons en position  $\alpha$  du carbone porteur du groupement carboxylique de la plupart des di- et de tri- acides carboxyliques testés nuisent à l'activation de ce carbone et induisent donc des rendements d'amidation très faibles.

#### III.3.2.3.3. Interférences

Une étude des interférents potentiels à la méthode de détection que nous avons développée a été réalisée afin de savoir si d'autres composés organiques et /ou inorganiques, trouvés fréquemment dans les échantillons testés, peuvent empêcher la détection des AGV.

Il existe différents types d'interférences potentielles induites par la présence de composés organiques ou inorganiques.

En effet, ces composés peuvent :

- soit réagir avec l'amine fluorescente, augmentant ainsi la réponse de l'intensité de fluorescence réelle : Ce type d'interférence peut être causé par des composés naturels organiques avec des groupes fonctionnels réactifs, tels que les acides humiques, les acides aminés, les hydrates de carbone, ou les aldéhydes) ;

- soit empêcher la dérivation et donc la détection des AGV : il peut s'agir des alcools, des amines et des cations métalliques.

Le tableau 27 montre les concentrations maximales tolérables des composés organiques ou minéraux potentiellement interférents, après dérivation de solutions standards contenant 50 mg.L<sup>-1</sup> d'acide acétique.

Les concentrations limites des composés présentés dans le tableau suivant représentent les concentrations de ces composés n'induisant pas une variation du signal de fluorescence des AGV de plus de 5%. En effet, un élément ou composé est considéré comme interférent lorsque sa concentration modifie de façon significative (supérieure à 5%) la valeur du signal résultant de la détection fluorimétrique du dérivé carboxylique.

**Tableau 27 : Concentration maximale tolérable de composés organiques et minéraux pour des solutions standards de 50 mg.L<sup>-1</sup> d'acide acétique**

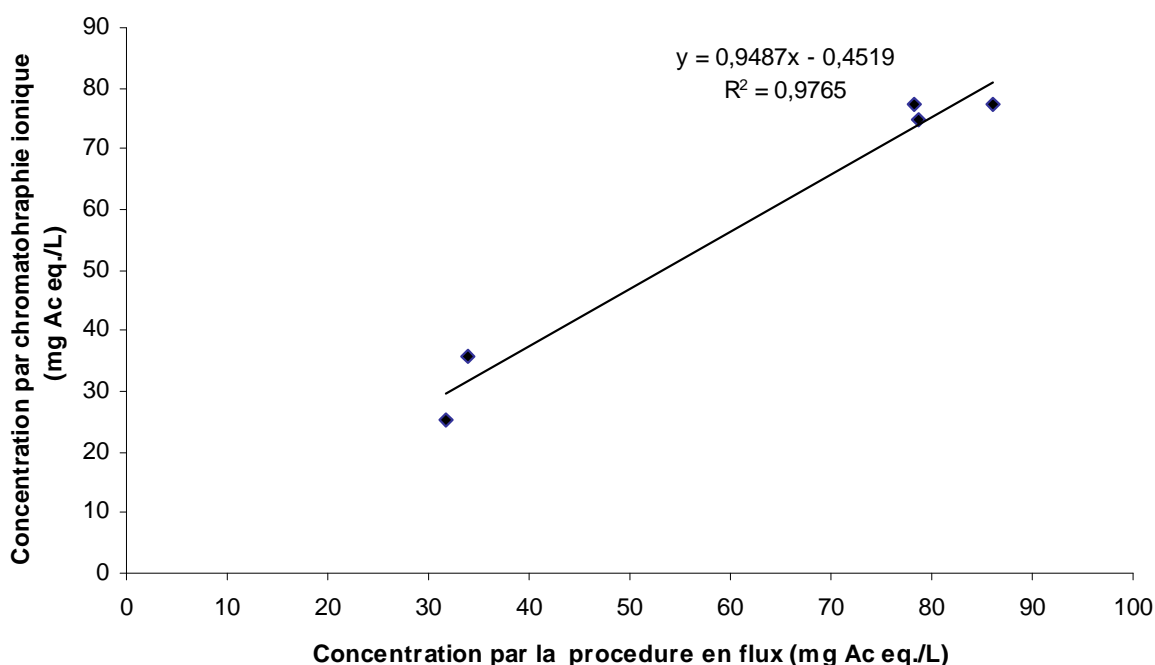
Composés interférents	Concentrations testées sans interférence (mg L <sup>-1</sup> )
Ethanol	340
Ethylamine	360
Cu <sub>2</sub> <sup>+</sup>	>1500
Fe <sub>3</sub> <sup>+</sup>	1400
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	750
Acide Humique	>1200
Glycine	340
Alanine	340
Glucose	340
Benzaldehyde	340
Butyraldehyde	340

#### III.3.2.4. Validation

La méthode proposée a été validée en analysant des échantillons de boues d'épuration. Ces échantillons provenant d'une station d'épuration de traitement des boues de Marseille, (France) ont été recueillis à différentes étapes de la digestion anaérobie (boues brutes à l'arrivée en station de traitement, avant et après les cuves de fermentation, et après traitement

final des boues). Avant analyse, ces échantillons ont été centrifugés à 6000 rpm pendant 15 min, puis filtrés grâce à des filtres PES 0,8µm.

Les échantillons ont été préalablement analysés par chromatographie ionique (HPIC), et les concentrations des AGV ont été exprimées en équivalent acide acétique (en mg.L<sup>-1</sup> d'acide acétique). La droite de régression établie entre les résultats obtenus par la méthode en flux et ceux obtenus par la méthode de référence (HPIC) a une pente proche de l'unité (Figure 74), ce qui montre que la justesse des résultats fournis par la méthode développée est bonne. Le coefficient de corrélation, de 0,9795 pour la détermination des AGV est très satisfaisant.



**Figure 74: Droite de corrélation établie entre les résultats obtenus par la procédure en flux et ceux obtenus par HPIC pour le dosage des AGV.**

#### III.3.2.5. Conclusion

Les résultats obtenus avec la méthode en flux sur des échantillons réels confirment la spécificité de la méthode pour la détection des acides gras volatils, ainsi que l'absence d'interférences potentielles causées par divers composants intrinsèques de l'échantillon.

C'est pourquoi, il nous semble que cette méthode automatisée de détection des AGV a un grand intérêt industriel et environnemental, particulièrement dans les stations de traitement des boues, puisque le suivi de la concentration de ces acides est couramment utilisé comme un indicateur physico-chimique de la digestion des matières organiques dans le digesteur. Les valeurs obtenues par cette méthode automatisée sont particulièrement précises pour ce type de processus, permettant de suivre les AGV dans une gamme allant de 19-1000 mg.L<sup>-1</sup> (exprimé en équivalent acide-acétique), avec une fréquence d'analyse pouvant atteindre neuf échantillons par heure.

Il est important de noter que les caractéristiques analytiques de la procédure ont été établies principalement en fonction du débit d'extraction. En conséquence, une augmentation du débit d'extraction permettrait d'augmenter les limites de détection et de quantification de la méthode et permettrait également d'augmenter la gamme de concentration analysable par la procédure en flux. Cette versatilité apportée par l'étape d'extraction, pourrait permettre d'adapter l'analyseur au suivi des AGV dans des réacteurs anaérobiques fonctionnant à des concentrations supérieures à 1000 mg.L<sup>-1</sup>.

# **Conclusion Générale**

La matière organique dissoute est composée d'un mélange complexe et extrêmement diversifié de familles de molécules organiques possédant une multitude de groupements fonctionnels qui leur procurent un caractère réactif important, selon l'environnement considéré. En conséquence, la MOD intervient dans de nombreuses réactions physiques, chimiques et biologiques dans écosystèmes naturels ou anthropisés, et est donc susceptible d'influencer les processus de transferts d'éléments aux interfaces, d'agir comme puits et source de nutriments, d'intervenir dans les cycles biogéochimiques, ainsi que dans le transport et la biodisponibilité des polluants.

L'objectif de ce travail était le développement d'une méthode alternative de détermination qualitative et quantitative des groupements fonctionnels de grand intérêt environnemental tel que les acides carboxyliques, les thiols et les amines, présents dans la matière organique de différents écosystèmes, et été porté par la nécessité d'une méthode de caractérisation rapide, simple et spécifique des principaux composés impliqués dans les diverses processus réactionnels de la MOD.

Le développement des méthodes alternatives de détection des groupements fonctionnels que nous avons mis au point est basé sur l'utilisation de techniques automatisées d'analyse en flux et de lecteurs de microplaques associées à des étapes de dérivation, de détection par fluorescence et d'extraction, chacune de ces étapes ayant été optimisée en fonction du groupement fonctionnel analysé.

Pour atteindre ces objectifs, une première étape basée sur l'étude des paramètres influençant la dérivation et la détection des composés étudiés a été effectuée. Lors de cette étude, des paramètres tels que le pH (de dérivation, activation/amidation/extraction (AGV), de réduction (thiols oxydés), de quantification d'interfèrent ( $\text{NH}_4^+$ ), le type et le pourcentage de solvants, le temps de réaction, la concentration et le ratio des réactifs, ont montré leurs rôles prépondérants dans la stabilité et l'intensité de fluorescence de chacun des dérivés formés. La prépondérance de ces différents paramètres et l'étude de leur interaction a été effectué soit de manière empirique (comme pour la méthode AGV), soit en utilisant des études multivariées par le biais de plans de criblage pour les composés aminés et thiols afin d'identifier les principaux paramètres d'influence.

Ces plans de criblage ont montré que, pour les composés aminés, un seul facteur avait une influence sur la formation du dérivé, alors que pour la dérivation des thiols, plusieurs

paramètres nécessitaient d'être optimisés simultanément. C'est pourquoi un plan d'expériences et de désirabilité a été réalisé uniquement pour les thiols, une approche pas-à-pas étant suffisante pour les composés aminés. Ces plans (de criblage puis d'expériences et enfin de désirabilité) ont permis d'optimiser tous ces paramètres, en un minimum d'expériences (selon l'un des principes de la *chimie verte*) et d'apporter de nombreuses informations sur les interactions entre chacun de ces paramètres (et ainsi d'élucider les contradictions relevées dans les différentes publications scientifiques).

Suite à l'optimisation de ces paramètres, les méthodes développées ont été automatisées soit pour un suivi en ligne (système en flux), soit pour un suivi sur site et *off-line* (lecteur de microplaques).

Parmi les techniques d'automatisation en flux, le système combiné MSFIA-MPSA a été retenu pour la détermination des concentrations en AGV. Cette technique est particulièrement adaptée au suivi de ces composés dans des systèmes anaérobiques (stations d'épurations, stations de traitement des boues, usines de méthanisation, ...). Les différents paramètres de l'analyse en flux (vitesse de détection, réacteur de mélange, cellule de détection, agencement du mélange réactionnel, cellule d'extraction, débit) ont été étudiés et optimisés.

La mise au point de l'analyse de composés aminés et thiols a été effectuée pour des applications *off-line*, par la mise au point de kits de détection en microplaques fonctionnant sur la base d'une détection fluorimétrique. Les conditions opératoires (temps d'agitation, température, volume de l'échantillon, programme d'exécution) ainsi que le matériel de la microplaque ont été développés et optimisés pour chacune de ces deux fonctions.

Les kits développés ainsi que la méthode en flux ont été validés soit par des méthodes de références (chromatographiques), soit par la méthode des ajouts dosés (dans les cas où il n'existait pas de méthode de référence). Ces validations sur des échantillons synthétiques et réels se sont avérées pleinement satisfaisantes. Les caractéristiques analytiques des méthodes de détection des thiols et des composés aminés ont montré de meilleures performances que les méthodes conventionnelles de quantification (par exemple par rapport à la méthode d'Ellman, permettant la quantification des composés thiols). Les performances analytiques obtenues pour l'analyse en flux des AGV permettent une applicabilité de notre méthode avec les concentrations fréquemment rencontrées dans les systèmes de traitements anaérobiques.



Le couplage de la dérivation par fluorescence de ces fonctions d'intérêt environnemental et industriel à des techniques d'automatisation et de kits microplaque a permis le développement et la mise au point de méthodes simples, rapides, spécifiques et adaptées à l'analyse d'un nombre important d'échantillons pour lesquels la mise en œuvre de méthodes standard peut être fastidieuse et difficile à mettre en place, particulièrement pour les analyses sur site.

C'est pourquoi, il nous semble que les méthodes proposées dans ce travail de recherche sont particulièrement adaptées pour leur utilisation sur site, voire en laboratoire, pour le suivi en temps réel de l'évolution de ces composés. De plus, les faibles quantités de réactifs mis en œuvre pour ces déterminations entrent pleinement dans les objectifs de la *chimie verte*.

A la fin de ce travail doctoral, on peut mettre en évidence de nombreuses applications et des perspectives de recherche à la fois dans le domaine fondamental et dans le domaine appliqué. A titre d'exemples, les premières applications et développements devraient concerner :

- l'intégration des données permises par les kits développés dans l'objectif de contribuer à l'amélioration des modèles géochimiques utilisés pour l'étude des transferts réactifs afin de comprendre les mobilisations polluants (métaux, pesticides, etc.) dans les sols et mieux surveiller la qualité des eaux. La prise en compte des sites de complexation potentiels présents à la surface de la MOD (thiols, carboxyliques, amines) devrait permettre de mieux appréhender les phénomènes de complexation et donc de mieux prédire le transfert des contaminants métalliques dans la biosphère (par exemple, un modèle de type PHREECQ-MOD) ;
- la méthode mise au point pour la détection des groupements thiols devrait être étendue à des composés de haut intérêt environnemental et sanitaire, comme l'hydrogène sulfuré ( $H_2S$ ) ;
- la méthode mise au point pour les amines pourraient être étendue et optimisée pour la détection sélective des chloramines qui sont le sujet actuellement d'interrogations persistantes sur leur dangerosité et sur leur présence importante dans les piscines désinfectées au chlore (Afsset, 2010).

Ces exemples ne sont donnés qu'à titre indicatif mais soulignent l'intérêt potentiel des travaux menés dans le cadre de ce travail de thèse.



# Références Bibliographiques

Abbt-Braun G., Lankes U., Frimmel F.H. **Structural characterisation of aquatic humic substances - The need for a multiple method approach**, *Aquatic Sciences*, 66, 151-170, 2004.

Afsset (rapport). **Evaluation des risques sanitaires liés aux piscines. Partie 1 : Piscines réglementées**, 242 pp. (ISBN 978-2-11-098863-5), 2010 ([http://www.afsset.fr/upload/bibliotheque/164592310755299019651309405739/10\\_06\\_afsset\\_piscines\\_reglementees.pdf](http://www.afsset.fr/upload/bibliotheque/164592310755299019651309405739/10_06_afsset_piscines_reglementees.pdf))

Almendros G., Guadalix M.E., Gonzalez-Villa F.J., Martin F. **Preservation of aliphatic macromolecules in soil humins**, *Organic Geochemistry*, 24(6-7), 651-659, 1996.

Aminuddin M., Miller J.N. **New fluorogenic reagents and their fluorescent reactions for amino acid measurements**, *Talanta*, 42(6), 775-778, 1995.

Antia N.J., Harrison P.J., Oliveira L. **The role of dissolved organic nitrogen in phytoplankton nutrition, cell biology and ecology**, *Phycologia*, 30(1), 1-89, 1991.

Artinger R., Buckau G., Geyer S., Fritz P., Wolf M., Kim J. **Characterization of groundwater humic substances: influence of sedimentary organic carbon**, *Applied Geochemistry*, 15, 97-116, 2000.

Audry S. **Bilan géochimique du transport des éléments métalliques dans le système fluvial anthropisé Lot-Garonne-Gironde**, Université de Bordeaux I, 415 pp.

Baker A., Spencer R.G.M. **Characterization of dissolved organic matter from source to sea using fluorescence and absorbance spectroscopy**, *Science of the Total Environment*, 333 (1-3), 217-232, 2004.

Baker A., Inverarity R., Charlton M., Richmond S. **Detecting river pollution using fluorescence spectrophotometry: case studies from the Ouseburn, NE England**, *Environmental Pollution*, 124(1), 57-70, 2003.

Baker W., Collis C.B. **Fluorescent acylating agents derived from 7-hydroxycoumarin**, *Journal of the Chemical Society*, S12-S15, 1949.

Baldock J.A., Nelson P.N. **Soil organic matter**. In: *Handbook of Soil Science*, Edité par Sumner M.E, CRC Press, Boca Raton, USA, pp. B25-B84, 2000.

Barraclough D. **The direct or MIT route for nitrogen immobilization: A <sup>15</sup>N mirror image study with leucine and glycine**. *Soil Biology and Biochemistry*, 29, 101-108, 1997.

Bass R., Ruddock L.W, Klappa P. Freedman R.B. **A major fraction of endoplasmic reticulum-located glutathione is present as mixed disulfides with protein**, *Journal of Biological Chemistry*, 279, 5257-5262, 2004.

Batiha M.A., Kadhum A.A.H., Mohamad A.B., Takriff M.S., Fisal Z., Wan Daud W.R., Batiha M.M. **Modeling the fate and transport of non-volatile organic chemicals in the agro-ecosystem: A case study of Cameron Highlands, Malaysia**, *Process Safety and Environmental Protection*, 87, 121-134, 2009.

Beale S.C., Hsieh Y.-Z., Wiesler D., Novotny M. **Application of 3-(2-furoyl)quinoline-2-carbaldehyde as a fluorogenic reagent for the analysis of primary amines by liquid chromatography with laser-induced fluorescence detection**, *Journal of Chromatography A*, 499, 579-587, 1990.

Beale S.C., Savege J., Hsieh Y.-Z., Wiesler D., Wiestock S., Novotny M. **Fluorescence reagents for high-sensitivity chromatographic measurements of primary amines**, *Analytical Chemistry*, 60(17), 1765-1769, 1988.

Bergknut M., Meijer S., Hallsall C., Ågren A., Laudon H., Köhler S., Jones K.C., Tysklind M., Wiberg K. **Modelling the fate of hydrophobic organic contaminants in a boreal forest catchment: A cross disciplinary approach to assessing diffuse pollution to surface waters**, *Environmental Pollution*, 158, 2964-2969, 2010.

Billiet H.A.H. **Chapitre 25 : Amines from Environmental Sources**. In: *Journal of Chromatography Library*, 51(2), B583-B595, 1992.

Blanchard C. **Caractérisation de la mobilité potentielle des polluants inorganiques dans les sols pollués**, Institut National des Sciences Appliquées de Lyon, 241 pp., 2000.

Boulegue J., Lord C. J., Church T.M. **Sulphur speciation and associated trace metals (Fe, Cu) in the porewaters of Great Marsh, DE**, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 46, 453-64, 1982.

Bowyer J.F., Clausing P., Newport D. **Determination of d-amphetamine in biological samples using high-performance liquid chromatography after precolumn derivatization with o-phthalaldehyde and 3-mercaptopropionic acid**, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 666(2), 241-250, 1995.

Box GEP, Hunter JS. **The 2k-p fractional factorial designs, Part I**, *Technometrics*, 3, 311-351, 1961a.

Box GEP, Hunter JS. **The 2k-p fractional factorial designs, Part II**, *Technometrics*, 3, 449-458, 1961b.

Buffle J., Leppard G.G. **Characterization of aquatic colloids and macromolecules. 1- Structure and behaviour of colloidal material. 2- Key role of physical structures on analytical results**. *Environmental Science and Technology*, 29, 2169-2184, 1995.

Burns J.A. Butler J.C., Moran J., Whitesides G.M. **Selective reduction of disulfides by tris(2-carboxyethyl)phosphine**, *Journal of Organic Chemistry*, 56, 2648-2650, 1991.

Calvet R. **Le Sol. Propriétés et fonctions. Volume 1 : Constitution et structure, phénomènes aux interfaces**, Edition France Agricole, Dunod, 456 pp., 2003.

Campins-Falcó P., Molins-Lagua C., Sevillano-Cabeza A., Tortaja Genaro L.A. **O-Phthalaldehyde-N-acetylcystein polyamine derivatives: formation and stability in solution and C18 support**, *Journal of Chromatography B*, 759, 285-297, 2001.

- Carneiro J.M.T., Dias A.C.B., Zagatto E.A.G., Santos J.L.M., Lima J.L.F.C. **An improved sampling approach in multi-pumping flow systems applied to the spectrophotometric determination of glucose and fructose in syrups**, *Analytica Chimica Acta*, 531(2), 279-284, 2005.
- Carneiro J.M.T., Zagatto E.A.G., Santos J.L.M., Lima J.L.F.C. **Spectrophotometric determination of phytic acid in plant extracts using a multi-pumping flow system**, *Analytica Chimica Acta*, 474(1-2), 161-166, 2002.
- Cerdà V., Estela J.M., Forteza R., Cladera A., Becerra E., Altimira P., Sitjar P. **Flow injection techniques in water analysis**, *Talanta*, 695, 695-705, 1999.
- Chen R., Bada J.L. **The fluorescence of dissolved organic matter in pore waters of marine sediments**, *Marine Chemistry*, 45, 31-42, 1994.
- Chen W., Wasterhoff P., Leenher J.A., Booksh K. **Fluorescence Excitation-Emission Matrix regional integration to quantify spectra for Dissolved Organic Matter**, *Environmental Science and Technology*, 37, 3701-3710, 2003.
- Chin C.C.Q., Wold F. **The use of tributylphosphine and 4-(aminosulfonyl)-7-fluoro-2, 1, 3-benzoxadiazole in the study of protein sulphydryls and disulfides**, *Analytical Biochemistry*, 214, 128-134, 1993.
- Chun-Ting K., Po-Yen W., Chien-Hou W. **Fluorimetric determination of ammonium ion by ion chromatography using post-column derivatization with o-phthalaldehyde**, *Journal of Chromatography A*, 1085, 91-97, 2005.
- Coble P.G. **Characterization of marine and terrestrial DOM in seawater using excitation-emission matrix spectroscopy**, *Marine Chemistry*, 51 (4), 325-346, 1996.
- Cobo M., Silva M. **Continuous solid-phase extraction and dansylation of low-molecular-mass amines coupled on-line with liquid chromatography and peroxyoxalate chemiluminescence-based detection**, *Journal of Chromatography A*, 848(1-2), 105-115, 1999.
- Croué J.P., Benedetti M.F., Violleau D., Leenheer J.A. **Characterization and copper binding of humic and nonhumic organic matter isolated from the South Platte River: Evidence for the presence of nitrogenous binding site**, *Environmental Science and Technology*, 37(2), 328-336, 2003.
- Croué J.-P., Korshin G.V., Benjamin M. **Characterization of Natural Organic Matter in Drinking Water**, *American Water Works Association Research Foundation: Denver, CO*, 2000.
- Davis W.M., Erickson C.L., Johnston C.T., Delfino J.J., Porter J.E. **Quantitative Fourier transform infrared spectroscopic investigation on humic substance functional group composition ?**, *Chemosphere*, 38, 2913-2928, 1999.
- DeBruyn AMH, Gobas F.A.P.C. **Modelling the diagenetic fate of persistent organic pollutants in organically enriched sediments**. *Ecological Modelling*, 179, 405-416, 2004.

De Montigny P., Stobaugh J.F., Givens R.S., Karlson R.G., Srinivachar K., Sternson L.A., Higuchi T. **Naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde/cyanide ion: A rationally designed fluorogenic reagent for primary amines**, *Analytical Chemistry*, 59, 1096-1101, 1987.

Dias A.C.B., Santos J.L.M., Lima J.L.F.C., Zagatto E.A.G. **Multi-pumping flow system for spectrophotometric determination of bromhexine**, *Analytica Chimica Acta*, 499(1-2), 107-113, 2003.

Dignac M. F., Ginestet P., Bruchet A., Audic J. M., Derenne S., Largeau C. **Changes in the organic composition of wastewater during biological treatment as studied by NMR and IR spectroscopies**, *Water Science and Technology*, 43 (2), 51-58, 2001.

Dignac M.-F. **Caractérisation chimique de la matière organique au cours du traitement des eaux usées par boues activées**, *Centre International de recherche sur l'eau et l'environnement*, Université de Paris VI, 303 pp., 1998.

Dignac M.-F., Derenne S., Ginestet P., Bruchet A., Knicker H., Largeau C. **Determination of structure and origin of refractory organic matter in bioepurated wastewater via spectroscopic methods: comparison of conventional and ozonation treatments**, *Environmental Science and Technology*, 34, 3389–3394, 2000.

Droesbeke J.-J., Fine J., Saporta G. **Plans d'expérience : Applications à l'entreprise**, Edition Technip, Paris, 520 pp., 1997.

Dryden C.L., Gordon A.S., Donat J.R. **Seasonal survey of copper-complexing ligands and thiol compounds in a heavily utilized, urban estuary: Elizabeth River, Virginia**, *Marine Chemistry*, 103, 276–288, 2007.

Dudal Y., Holgado R., Maestri G., Guillon E., Dupont L. **Rapid screening of DOM's metal-binding ability using a fluorescence-based microplate assay**, *Science of the Total Environment*, 354, 286–291, 2006.

Dunkellog R., Ruttinger H.-H., Peisker K. **Comparative study for the separation of aquatic humic substances by electrophoresis**, *Journal of Chromatography A*, 777(2), 355-362, 1997.

Egwim I.O.C., Gruber H.J. **Spectrophotometric Measurement of mercaptans with 4,4'-Dithiodipyridine**, *Analytical Biochemistry*, 288(2), 188-194, 2001.

Eyer P., Worek F., Kiderlen D., Sinko G., Stuglin A., Simeon-Rudolf V., Reiner E. **Molar absorption coefficients for the reduced Ellman reagent : reassessment**, *Analytical Biochemistry*, 312(2), 224-227, 2003.

Fajardo Y., Gomez E., Garcias F., Cerdà V., Casas M. **Development of an MSFIA-MPFS pre-treatment method for radium determination in water samples**, *Talanta*, 71(3), 1172-1179, 2007.

Farrell B.M., Jefferies T.M. **An investigation of high-performance liquid chromatographic methods for the analysis of amphetamines**, *Journal of Chromatography B*, 272(1), 111-128, 1983.

Field J.A., Leenheer J.A., Thorn K.A., Barber L.B., Rostad C., Macalady D.L., Daniel S.R. **Identification of persistent anionic surfactant-derived chemicals in sewage effluent and groundwater**, *Journal of Contaminant Hydrology*, 9(1-2), 55-78, 1992.

Fisher R.A. **Statistical Methods for Research Workers**, Edition Oliver and Boyd, Edinburgh, 239 pp., 1925.

Fleury M.O., Ashley D.V. **High-performance liquid chromatographic analysis of amino acids in physiological fluids: on-line precolumn derivatization with *o*-phthaldialdehyde**, *Analytical Biochemistry*, 133, 330-335, 1983.

Flock O.R., Andreae M.O., Drager M. **Environmentally relevant precursors of carbonyl sulfide in aquatic systems**, *Marine Chemistry*, 59, 71-85, 1997.

Friedman M., Zahnley J.C., Wagner J.R. **Estimation of the disulfide content of trypsin inhibitors as S-b-(2-pyridylethyl)-L-cysteine**, *Analytical Biochemistry*, 106, 27-34, 1980.

Galapate R.P., Baes A.U., Ito K., Mukai T., Shoto E., Okada M. **Detection of domestic wastes in kurose river using synchronous fluorescence spectroscopy**, *Water Research*, 32(7), 2232-2239, 1998.

Gilbert HF. **Redox control of enzyme activities by thiol/disulfide exchange**, *Methods in Enzymology*, 107, 330-351, 1984.

Godel H., Graser T., Foldi P., Pfaender P., Furst, P. **Measurement of free amino acids in human biological fluids by high-performance liquid chromatography**, *Journal of Chromatography A*, 297, 49-61, 1984.

Gonzales-Vila F.J., Tinoco P., Almendros G., Martin F. **Pyrolysis-GC-MS analysis of the formation and degradation stages of charred residues from lignocellulosic biomass**, *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 49, 1128-1131, 2001.

Goullet A., Glasgow I., Aubry N. **Effects of microchannel geometry on pulsed flow mixing**, *Mechanics Research Communications*, 33(5), 739-746, 2006.

Graham D.E., Harich K.C., White R.H. **Reductive dehalogenation of monobromobimane by tris(2-carboxyethyl)phosphine**, *Analytical Biochemistry*, 318, 325-328, 2003.

Graser T., Godel H., Albers S., Foldi P., Furst, P. **An ultra rapid and sensitive high-performance liquid chromatographic method for determination of tissue and plasma free amino acids**, *Analytical Biochemistry*, 151(1), 142-152, 1985.

Grassetti D.R., Murray Jr J.F. **Determination of sulfhydryl groups with 2,2'- or 4,4'-dithiodipyridine**, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 119, 41-49, 1967.



Han J.C. Han G.Y. **A procedure for quantitative determination of tris(2-carboxyethyl)phosphine, an odorless reducing agent more stable and effective than dithiothreitol**, *Analytical Biochemistry*, 220, 5-10, 1994.

Hansen R.E., Winther J.R. **An introduction to methods for analyzing thiols and disulfides: reactions, reagents, and practical considerations**, *Analytical Biochemistry*, 394, 147-158, 2009.

Hatcher P.G., Dria K.J., Kim S., Frazier S.W. **Modern analytical studies of humic substances**. *Soil Science*, 166 (11), 770-794, 2001.

Hautala K., Peuravuori J., Pihlaja K. **Measurement of aquatic humus content by spectroscopic analyses**, *Water Research*, 34, 246-258, 2000.

Hedges J.I., Eglinton G., Hatcher P.G., Kirchman D.L., Arnosti C., Derenne S., Evershed R. P., Kogel-Knabner I., de Leeuw J.W., Littke R. **The molecularly-uncharacterized component of nonliving organic matter in natural environments**, *Organic Geochemistry*, 31(10), 945-958, 2000.

Herráez Hernández R., Campíns Falcó P., Sevillano Cabeza A. **Determination of amphetamine and related compounds in urine using on-line derivatization in octadecyl silica columns with 9- fluorenylmethyl chloroformate and liquid chromatography**, *Journal of Chromatography B*, 679(1-2), 69-78, 1996.

Hesse S., Frimmel F.H. **Biochemical characterization of refractory organic substances**, *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica*, 27(2), 94-97, 1999.

Hodge A., Robinson D., Fitter A. **Are microorganisms more effective than plants at competing for nitrogen?** *Trends in Plant Science*, 5, 304-308, 2000a.

Hodge A., Stewart J., Robinson D., Griffiths B.S., Fitter A.H. **Plant N capture and microfaunal dynamics from decomposing grass and earthworm residues in soil**, *Soil Biology Biochemistry*, 32, 1763-1772, 2000b.

Hope D., Billett M.F., Cresser M.S. **A review of the export of carbon in river water : fluxes and processes**, *Environmental Pollution*, 84(3), 301-324, 1994.

Hudson N., Baker A., Reynolds D. **Fluorescence analysis of dissolved organic matter in natural, waste and polluted waters - A review**, *River Research and Applications*, 23 (6), 631-649, 2007.

Hureiki L. **Etude de la chloration et de l'ozonation d'acides aminés libres et combinés en milieu aqueux dilué**, Thèse de Doctorat, Université de Poitiers. 1993.

Imai A., Fukushima T., Matsushige K., Kim Y-H., Choi K. **Characterization of dissolved organic matter in effluents from wastewater treatment plants**, *Water Research*, 36(4), 859-870, 2002.

Jablonski A. **Efficiency of anti-Stokes fluorescence dyes**, *Nature*, 131, 839-840, 1933.

Jacques D., Simunek J., Mallants D., van Genuchten M.Th. **Modelling coupled water flow, solute transport and geochemical reactions affecting heavy metal migration in a podzol soil**, *Geoderma*, 145, 449-461, 2008.

Jadas-Hécart A. **Contribution à l'étude de la demande en chlore à long terme d'une eau potable. Modélisation et identification de précurseurs organiques**, Thèse de Doctorat, Université de Poitiers, 1989.

Janik L.J., Skjemstad J.O., Raven M.D. **Characterization and analysis of soils using midifred partial least squares I. Correlations with XRF-determined major element composition**, *Australian Journal of Soil Research*, 33, 621-636, 1995.

Jauzein M., Feix I., Wiart J. **Les micropolluants organiques dans les boues résiduaire des stations d'épuration urbaines**, Rapport ADEME, 224 pp., (ISBN 2-86817-101 X), 1995.

Jocelyn P.C. **Chemical-reduction of disulfides**, *Methods in Enzymology*, 143, 246-256, 1987.

Jocelyn P.C., Kamminga A. **Development of fluorescence between *o*-phtaldialdehyde and thiols**, *Analytical Biochemistry*, 37, 417-421, 1970.

Johnson D.C., Pobberpuhl D., Roberts R., Vandenberg P. **Pulsed amperometric detection of carbohydrates, amines and sulfur species in ion chromatography the current state of research**, *Journal of Chromatography A*, 640(1-2), 79-96, 1993.

Jones D.L., Darrah P.R. **Amino-acid influx at the soil-root interface of *Zea mays* L. and its implications in the rhizosphere**, *Plant and Soil*, 163, 1-12, 1994.

Jørgensen N.O.G. **Uptake of glycine and release of primary amines by the polychaete *Nereis virens* (Sars) and the mud snail *Hydrobia neglecta* Muus**, *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 47, 281-297, 1980.

Jørgensen N.O.G. **Annual variation of dissolved free primary amines in estuarine water and sediment**, *Oecologia*, 40, 207-217, 1979.

Kamisaki Y., Takao Y., Itoh T., Shimomura T., Takahashi K., Uehara N., Yoshino Y. **Determination of gamma-amino-butyric acid in human cerebrospinal fluid by isocratic high-performance liquid chromatography**, *Journal of Chromatography B*, 529, 417-423, 1990.

Kang K-H., Shin H.S., Park H. **Characterization of humic substances present in landfill leachates with different landfill ages and its implications**, *Water Research*, 36(16), 4023-4032, 2002.

Kielland K. **Landscape pattern of free amino acids in arctic tundra soils**, *Biogeochemistry*, 31, 85-98, 1995.

Kirley T.L. **Reduction and fluorescent labelling of cysteine-containing proteins for subsequent structural analyses**, *Analytical Biochemistry*, 180, 231-236, 1989.

- Ko W., Yu C., Hsu K. **Changes in conformation and sulfhydryl groups of tilapia actomyosin by thermal treatment**, *LWT - Food Science and Technology*, 40(8), 1316-1320, 2007.
- Kobayashi M., Chiba Y. **Water-soluble carbodiimide for the fluorescent measurement of the carboxyl group produced by enzyme reactions**, *Analytical Biochemistry*, 219, 189-194, 1994.
- Kögel-Knabner I.  **$^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  NMR spectroscopy as a tool in soil organic matter studies**, *Geoderma*, 80, 243-270, 1997.
- Kögel-Knabner I. **The macromolecular organic composition of plant and microbial residues as inputs to soil organic matter**, *Soil Biology & Biochemistry*, 34, 139-162, 2002.
- Koning H., Wolf H., Venoma K., Korf J. **Automated precolumn derivatization of amino acids, small peptides, brain amines and drugs with primary amino groups for reversed-phase high-performance liquid chromatography using naphthalenedialdehyde as the fluorogenic label**, *Journal of Chromatography B*, 533, 171-178, 1990.
- Kosower E.M, Kosower N.S. **Bromobimane probes for thiols**, *Methods in Enzymology*, 251, 133-148, 1995.
- Kramer J.R., Bell R.A., Smith S. **Determination of sulfide ligands and association with natural organic matter**, *Applied Geochemistry*, 22, 1606-1611, 2007.
- Labanowski J. **Matière organique naturelle et anthropique: vers une meilleure compréhension de sa réactivité et de sa caractérisation**, Thèse de doctorat, Université de Limoges, 2004.
- Lagier T. **Etude des macromolécules de lixiviat, caractérisation et comportement vis à vis des métaux**, Thèse de doctorat, Université de Poitiers, 2000.
- Lahav O., Morgan B. **Appropriate methodologies for monitoring of anaerobic digestion in developing countries – A review**. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 79, 1331-1341, 2004.
- Lahav O., Morgan B.E, Loewenthal R.E. **Rapid, simple and accurate method for measurement of VFA and carbonate alkalinity in anaerobic reactors**, *Environmental Science and Technology*, 36(12), 2736-2741, 2002.
- Lapa R.A.S., Lima J.L.F.C., Reis B.F., Santos J.L.M., Zagatto E.A.G. **Multi-pumping in flow analysis: concepts, instrumentation, potentialities**, *Analytica Chimica Acta*, 466(1), 125-132, 2002.
- Leenheer J.A., Rostad C.E. **Fractionation and characterization of organic matter in wastewater from a Swine waste-retention basin**, *Scientific Investigations Report 2004-5217*, U.S. Department of the Interior and U.S. Geological Survey, 21, 2004.
- Leenheer J.A., Croué J.P. **Characterizing aquatic dissolved organic matter**, *Environmental Science and Technology*, 37(1), 18A-26A, 2003.

Lenth R.V. **Quick and Easy Analysis of Unreplicated Factorials**, *Technometrics*, 31, 469-473, 1989.

Lewis G.A., Mathieu D., Phan-Tan-Luu R. **Pharmaceutical Experimental Design**, Marcel Dekker Inc., New York, Basel, 1999.

Lingeman H. Tjaden U.R., van Den Beld C.M.B., van der Greef J. **Conventional and laser induced fluorescence detection of glucuronic acid conjugates after derivatization and liquid chromatographic separation**, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 6, 687-695, 1988.

Lima J.L.F.C., Oliveira Sa S.M., Santos J.L.M., Zagatto E.A.G. **Multi-pumping flow system for the spectrophotometric determination of dipyrone in pharmaceutical preparations**, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 32(4-5), 1011-1017, 2003.

Lima J.L.F.C., Santos J.L.M., Dias A.C.B., Ribeiro M.F.T., Zagatto E.A.G., **Multi-pumping flow systems: an automation tool**, *Talanta*, 64(5), 1091-1098, 2004.

Lock J, Davis J. **The determination of disulphide species within physiological fluids**, *Trends in Analytical Chemistry*, 21(12), 807-815, 2002.

Lopes C.M.P.V., Almeida A.A., Santos J.L.M., Lima J.L.F.C. **Automatic flow system for the sequential determination of copper in serum and urine by flame atomic absorption spectrometry**, *Analytica Chimica Acta*, 555(2), 370-376, 2006.

Luther G.W. III, Church, T.M., Scudlark J.R., Cosman M. **Inorganic and organic sulphur cycling in salt marsh porewaters**, *Science*, 232, 746-749, 1986.

Mac Carthy P. **The principles of humic substances**, *Soil Science*, 166(11), 738-751, 2001.

Malcolm R.L., Mac Carthy P. **Quantitative evaluation of XAD 8 and XAD 4 resins used in tandem for removing organic solutes from water**, *Environment International*, 18, 597-607, 1992.

Mana H., Spohn U. **Rapid and selective determination of ammonium by fluorimetric flow injection analysis**, *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 366, 825-829, 2000.

Mann R. **The plastics historical society**, oral communication presented at the Conference MipTec-ICAR'99, Montreux, 1999 (<http://www.plastiquarian.com>).

Martin-Mousset B., Croué J.P., Lefebvre E., Legube B. **Distribution and characterization of the dissolved organic matter of surfaces waters**, *Water Research*, 31(3), 541-553, 1997.

Masini J.C., Abate G., Lima E.C., Hahn L.C., Nakamura M.S., Lichtig J., Nagatomy H.R. **Comparison of methodologies for determination of carboxylic and phenolic groups in humic acids**, *Analytica Chimica Acta*, 364 (1-3), 223-233, 1998.

Matilainen A., Vepsäläinen M., Sillanpää M. **Natural organic matter removal by coagulation during drinking water treatment: A review**, *Advances in Colloid and Interface Science*, 159(2), 189-197, 2010.

McDonald S., Bishop A.G., Prenzler P.D., Robards K. **Analytical chemistry of freshwater humic substances**, *Analytica Chimica Acta*, 527(2), 105-124, 2004.

Meister A., Anderson ME. **Glutathione**, *Annual Review of Biochemistry*, 52, 711-760, 1983.

Meseguer Lloret S., Verdu Andres J., Molins Legua C., Campins Falco P. **Determination of ammonia and primary amine compounds and Kjeldahl nitrogen in water samples with a modified Roth's fluorimetric method**, *Talanta*, 65, 869-875, 2005.

Meulendijk, J.A.P., Underberg W.J.M. **Detection Oriented Derivatization Techniques in Liquid Chromatography**, H. Lingeman and W.J.M. Underberg (Eds), pp. 247-281, Marcel Dekker, New York, 1990.

Miano T.M., Senesi N. **Synchronous excitation fluorescence spectroscopy applied to soil humic substances chemistry**, *Science of the Total Environment*, 117, 41-51, 1992.

Michel K., Roose M., Ludwig B. **Comparison of different approaches for modelling heavy metal transport in acidic soils**, *Geoderma*, 140, 207-214, 2007.

Mobed J.J., Hemmingsen S.L., Autry J.L., McGown N.B. **Fluorescence characterization of IHSS humic substances: total luminescence spectra with absorbance correction**, *Environmental Science and Technology*, 30, 3061-3065, 1996.

Moosbrugger R.E., Wentzel M.C., Ekama G.A., Marais G.V.R. **A 5 point titration method for determining the carbonate and SCFA weak acid/bases in anaerobic systems**, *Water Science and Technology*, 28(2), 237-245, 1993.

Mopper K., Delmas D. **Trace determination of biological thiols by liquid chromatography and precolumn fluorometric labeling with o-phthalaldehyde**, *Analytical Chemistry*, 56, 2557-2560, 1984.

Morais I.P.A., Toth I.V., Rangel A.O.S.S. **An overview on flow methods for the chemiluminescence determination of phosphorus**, *Talanta*, 66(2), 341-347, 2005.

Newton G.L., Dorian, R., Fahey, R.C. **Analysis of biological thiols: derivatization with monobromobimane and separation by reverse-phase high-performance liquid chromatography**, *Analytical Biochemistry*, 114, 383-387, 1981.

Nimura N., Kinoshita T. **O-Phthalaldehyde-N-acetyl-L-cysteine as a chiral derivatization reagent for liquid chromatographic optical resolution of amino acid enantiomers and its application to conventional amino acid analysis**, *Journal of Chromatography A*, 352, 169-177, 1986.

Norme AFNOR (Agence Française de Normalisation) XP T 90-210, **Protocole d'évaluation d'une méthode alternative d'analyse physico-chimique quantitative par rapport à une méthode de référence**. Edition AFNOR, 401-442, 1996.

Owen A.G., Jones D.L. **Competition for amino acids between wheat roots and rhizosphere microorganisms and the role of amino acids in plant N acquisition**, *Soil Biology & Biochemistry*, 33, 651-657, 2001.

Parlanti E., Worz K., Geoffroy L., Lamotte M. **Dissolved organic matter fluorescence spectroscopy as a tool to estimate biological activity in a coastal zone submitted to anthropogenic inputs**, *Organic Geochemistry*, 31(12), 1765-1781, 2000.

Parmentier C., Leroy P., Wellman M., Nicolas A. **Determination of cellular thiols and glutathione-related enzyme activities: versatility of high-performance liquid chromatography-spectrofluorimetric detection**, *Journal of Chromatography B*, 719, 37-46, 1998.

Peuravuori J., Pihlaja K. **Isolation and characterization of natural organic matter from lake water: Comparison of isolation with solid adsorption and tangential membrane filtration**, *Environment International*, 23(4), 441-451, 1997a.

Peuravuori J., Pihlaja K. **Molecular size distribution and spectroscopic properties of aquatic humic substances**, *Analytica Chimica Acta*, 337(2), 133-149, 1997b.

Peuravuori J., Ingman P., Pihlaja K. **Critical comments on accuracy of quantitative determination of natural humic matter by solid state  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy**, *Talanta*, 59 (1), 177-189, 2003.

Peuravuori J., Pihlaja K., Valimäki N. **Isolation and characterization of natural organic matter from lake water: Two different adsorption chromatographic methods**, *Environment International*, 23(4), 453-464, 1997.

Piccolo A., Nardi S., Concheri G. **Macromolecular changes of humic substances induced by interaction with organic acids**, *Soil Science*, 47, 319-328, 1996.

Piccolo A., Zaccheo P., Genevivi P. **Chemical characterization of humic substances extracted from organic waste amended soils**, *Bioresource Technology*, 40, 275-282, 1992.

Pires C.K., Lavorante A.F., Marconi L.M.T., Meneses S.R.P., Zagatto E.A.G. **A multi-pumping flow system for chemiluminometric determination of ascorbic acid in powdered materials for preparation of fruit juices**, *Microchemical Journal*, 83(2), 70-74, 2006.

Pires C.K., Marques K.L., Santos J.L.M., Lapa R.A.S., Lima J.L.F.C., Zagatto E.A.G., **Chemiluminometric determination of carvedilol in a multi-pumping flow system**, *Talanta*, 68(2), 239-244, 2005.

Plackett R.L., Burman J.P. **The Design of Optimum Multifactorial Experiments**, *Biometrika*, 33, 303-325, 1946.

Poirier N., Derenne S., Rouzaud J.-N., Largeau C., Mariotti A., Balesdent J., Maquet J. **Chemical structure and sources of the macromolecular, resistant, organic fraction**

**isolated from a forest soil (Lacadée, south-west France), *Organic Geochemistry*, 31(9), 813-827, 2000.**

Pons C., Forteza R., Cerdà V. **Multi-pumping flow system for the determination, solid-phase extraction and speciation analysis of iron, *Analytica Chimica Acta*, 550(1-2), 33-39, 2005.**

Pons C., Forteza R., Cerdà V., Rangel A.O.S.S. **The application of multicommutated flow techniques to the determination of iron, *Trends in Analytical Chemistry*, 25(6), 583-588, 2006.**

Pons C., Toth I.V., Rangel A.O.S.S., Forteza R., Cerdà V. **Multi-pumping flow system for the determination of dissolved orthophosphate and dissolved organic phosphorus in wastewater samples, *Analytica Chimica Acta*, 572(1), 148-154, 2006.**

Poulin P., Pelletier E. **Determination of ammonium using a microplate-based fluorimetric technique, *Talanta*, 71, 1500-1506, 2007.**

Qualls R.G., Haine B.L. **Geochemistry of dissolved organic nutrients in water percolating through a forest ecosystem, *Soil Science Society of America Journal*, 55, 1112-1123, 1991.**

Reemtsma T. **The use of liquid chromatography-atmospheric pressure ionization mass spectrometry in water analysis - Part I: Achievements, *Trends in Analytical Chemistry*. 20(9), 500-517, 2001.**

Rey M.A., Pohl C.A. **Novel cation-exchange stationary phase for the separation of amines and of six common inorganic cations, *Journal of Chromatography A*, 739, 87-95, 1996.**

Reynolds D.M., Ahmad S.R. **Rapid and direct determination of wastewater BOD values using a fluorescence technique, *Water Research*, 31(8), 2012-2018, 1997.**

Reynolds D.M. **Rapid and direct determination of tryptophan in water using synchronous fluorescence spectroscopy, *Water Research*, 37(13), 3055-3060, 2003.**

Ribeiro M.F.T., Santos J.L.M., Lima J.L.F.C., Dias A.C.B., Zagatto E.A.G. **Single reaction interface in flow analysis, *Talanta*, 68(2), 351-358, 2005.**

Ringbom A. **Les complexes en chimie analytique**, Edition Dunod, Paris, 369 pp., 1967.

Rizzo V., Moltalbeti L., Valli M., Bosoni T., Scoglio E., Moratti R. **Study of factors affecting the determination of total plasma 7-fluorobenzo-2-oxa-1,3-diazole-4-sulfonate (SBD)-thiol derivatives by liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 706, 209-215, 1998.**

Robert-Peillard F., Palacio-Barco E., Dudal Y., Coulomb B., Boudenne J.L. **Alternative Spectrofluorimetric Determination of Short-Chain Volatile Fatty Acids in Aqueous Samples, *Analytical Chemistry*, 81, 3063-3070, 2009.**

Roth M. **Fluorescence reaction for amino acids, *Analytical Chemistry*, 43, 880-882, 1971.**

Ruegg U.T., Rudinger J. **Reductive cleavage of cystine disulfides with tributylphosphine**, *Methods in Enzymology*, 47, 111-116, 1977.

Ruzicka J., Hansen E.H. **Flow injection analyses: Part I. A new concept of fast continuous flow analysis**, *Analytica Chimica Acta*, 78(1), 145-157, 1975.

Saito K., Horie M., Nakazawa H. **Kinetic study of the stability of the o-phthalaldehyde-spermine fluorophore formed by on-column derivatization**, *Analytical Chemistry*, 66, 134-138, 1994.

Schuster R. **Determination of amino acids in biological, pharmaceutical, plant and food samples by automated precolumn derivatization and high-performance liquid chromatography**, *Journal of Chromatography B*, 431, 271-284, 1988.

Seeber G., Buchmeiser M.R., Bonn G.K., Bertsch T. **Determination of airborne, volatile amines from polyurethane foams by sorption onto a high-capacity ion-exchange resin based on poly(succinic acid)**, *Journal of Chromatography A*, 809(1-2), 121-129, 1998.

Sellner K.G., Nealley E.W. **Diel fluctuations in dissolved free amino acids and monosaccharides in Chesapeake Bay dinoflagellate blooms**, *Marine Chemistry*, 56, 193-200, 1997.

Sempéré R., Cauwet G. **Occurrence of organic colloids in the stratified estuary of the Krka River (Croatia)**, *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 40(1), 105-114, 1995.

Senesi N. **Metal-humic substance complexes in the environment. Molecular and mechanistic aspects by multiple spectroscopic approach**. In: *Adriano D.C (Ed), Biogeochemistry of Trace Metals*, Lewis Publishers, Boca Raton, 429-496, 1992.

Senesi N. **Molecular and quantitative aspects of the chemistry of fulvic acid and its interactions with metal ions and organic chemicals. Part II. The fluorescence spectroscopy approach**, *Analytica Chimica Acta*, 232, 77-106, 1990.

Senesi N., Miano T., Brunetti G. **Humic-like substances in organic amendments and effects on native soil humic substances**. In: *Humic substances in terrestrial ecosystem*. Piccolo A. (Ed), Elsevier, Amsterdam, 532-533. 1996.

Senft A.P., Dalton T.P., Shertzer H.G.. **Determining glutathione and glutathione disulfide using the fluorescence probe o-phthalaldehyde**, *Analytical Biochemistry*, 280, 80-86, 2000.

Sigg L., Behra P., Stumm W. **Chimie des milieux aquatiques: chimie des eaux naturelles et des interfaces dans l'environnement**, Edition Dunod, Paris, 567 pp., 2001

Skarping G., Dalene M., Lind P. **Determination of toluenediamine isomers by capillary gas chromatography and chemical ionization mass spectrometry with special reference to the biological monitoring of 2,4- and 2,6-toluene diisocyanate**, *Journal of Chromatography A*, 663(2), 199-210, 1994.

Skeggs L.T. **An automatic method for colorimetric analysis**, *American Journal of Clinical Pathology*, 28, 311-322, 1957.



Stevenson F.J. **Humic chemistry: Genesis, composition, reactions**, John Wiley & Sons (Eds), New York, 1982.

Stevenson F.J. **Humus chemistry: Genesis, composition, reactions**, 2nd Ed, John Wiley & Sons (Eds), New York. 1994.

Streat M., Sweetland L.A. **Physical and adsorptive properties of Hypersol-Macronet™ polymers**, *Reactive and Functional Polymers*, 35, 99-109, 1997.

Tamas L., Dudikova J., Durcekova K., Haluskova L., Huttova J., Mistrik I., Olle M. **Alterations of the gene expression, lipid peroxidation, proline and thiol content along the barley root exposed to cadmium**, *Journal of Plant Physiology*, 165, 1193-1203, 2008.

Tanaka T., Nagao S., Ogawa H. **Attenuated total reflectionfourier transform infrared (ATR-FTIR) spectroscopy of functional groups of humic acid dissolving in aqueous solution**, *Analytical Sciences*, 17(9), 1081-1084, 2001.

Tang D.G., Wen L.S., Santschi P.H. **Analysis of biogenic thiols in natural water samples by high-performance liquid chromatographic separation and fluorescence detection with ammonium 7-fluorobenzo-2-oxa-1,3-diazole-4-sulfonate (SBD-F)**, *Analytica Chimica Acta*, 408, 299-307, 2000.

Thurman E.M. **Organic Geochemistry of Natural Waters**, Martinus Nijhoff & Junk, D.W. Publishers, Dordrecht, 1985.

Tipping E. **Modelling Al competition for heavy metal binding by dissolved organic matter in soil and surface waters of acid and neutral pH**, *Geoderma*, 127, 293-304, 2005.

Toyo'oka T. **Modern Derivatization Methods for Separation Sciences**, John Wiley and sons, New York, 1999

Toyo'oka T. **Fluorescent tagging of physiologically important carboxylic acids, including fatty acids, for their detection in liquid chromatography**, *Analytica Chimica Acta*, 465, 111-130, 2002.

Traina S.J., Novak J., Smeck N.E. **An ultraviolet absorbance method of estimating the percent aromatic carbon content of humic acids**, *Journal of Environmental Quality*, 19, 151-153, 1990.

Vairavamurthy M.A., Maletic D., Wang S., Manowitz B., Eglinton T., Lyons T. **Characterization of sulfur-containing functional groups in sedimentary humic substances by X-ray absorption near-edge structure spectroscopy**, *Energy Fuels*, 11, 546–553, 1997.

Vairavamurthy M.A., Goldenberg W.S., Ouyang S., Khalid S. **The interaction of hydrophilic thiols with cadmium: investigation with a simple model, 3-mercaptopropionic acid**, *Marine Chemistry*, 70, 181-189, 2000.

Van Den Beld C.M.B., Lingeman H., Bayens W.R.G., Keukeleire D.D., Korkidis K. **Luminescence Techniques in Chemical and Biochemical Analysis**, Marcel Dekker, New York, pp. 237, 1991.

Vanloot P. **Développement d'un appareil automatisé de dosage du fer et de l'aluminium dans les eaux de consommation**, Thèse de doctorat, Université de Provence, 2006.

Vidal M., Santos M.J., Abrao T., Rodriguez J., Rigol A. **Modeling competitive metal sorption in a mineral soil**, *Geoderma*, 149, 189-198, 2009.

Wolf J.H., Korf J. **Improved automated precolumn derivatization reaction of fatty acids with bromomethylmethoxycoumarin as label**, *Journal of Chromatography A*, 502, 423-430, 1990.

Yasaka Y., Tanaka M., Shono T., Tetsumi T., Katakawa J. **2-(2,3-Naphthalimino)ethyl trifluoromethanesulfonate as a highly reactive ultraviolet and fluorescent labelling agent for the liquid chromatographic determination of carboxylic acids**, *Journal of Chromatography A*, 508, 133-140, 1990.

Ye K., Hamada M., Wu C.F.J. **A Step-Down Length Method for Analyzing Unreplicated Factorial Designs**, *Journal of Quality Technology*, 33, 140-152, 2001.

Yoo J.S., MacGuffin V.L. **Determination of Fatty Acids in Fish Oil Dietary Supplements by Capillary Liquid Chromatography with Laser-Induced Fluorescence Detection**, *Journal of Chromatography A*, 627(1-2), 87-96, 1992.

Yoshida S., Hirose S., Iwamoto M. **Use of 4-bromomethyl-7-methoxycoumarin for derivatization of pyrimidine compounds in serum analysed by high performance liquid chromatography with fluorometric detection**, *Journal of Chromatography B*, 383, 61-68, 1986.

Zeogouagh Y., Derenne S., Largeau C., Bertrand P., Sicre M.-A., Saliot A., Rousseau, B. **Refractory organic matter in sediments from the north-west African upwelling system: abundance, chemical structure and origin**, *Organic Geochemistry*, 30, 101-117, 1999.

Zsolnay A. **Dissolved humus in soil waters**, In: *Humic Substances in Terrestrial Ecosystems*, Piccolo A. (Eds.), Elsevier, Amsterdam, p. 171-223, 1996.

Zukowska B., Pacyna J., Namiesnik J. **Modelling of migration and fate of selected persistent organic pollutants in the Gulf of Gdansk and the Vistula catchment (Poland): selected results from the EU ELOISE EuroCat project**, *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 62, 467-476, 2005.



# **Annexes**

## Annexe 1

### Limites de qualité des eaux brutes de toutes origines utilisées pour la production d'eau destinée à la consommation humaine, à l'exclusion des eaux de source conditionnées et des eaux minérales naturelles

[Arrêté du 11 janvier 2007 relatif aux critères de qualité des eaux brutes et des eaux destinées à la consommation humaine mentionnées aux articles R.1321-2, R.1321-3, R.1321-7 et R.1321-38 du code de la santé publique].

Groupes de paramètres	Paramètres	Limites de qualités
Paramètres organoleptiques	Couleur (Pt)*	200 mg/l
Paramètres physico-chimiques liés à la structure naturelle des eaux	Chlorures (Cl <sup>-</sup> )*	200 mg/l
	Sodium (Na <sup>+</sup> )*	200 mg/l
	Sulfates (SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> )*	250 mg/l
	Taux de saturation en oxygène dissous pour les eaux superficielles*	> 30%
	Température <sup>*,†</sup>	< 25°C
Paramètres concernant les substances indésirables	Agents de surface réagissant au bleu de méthylène (lauryl-sulfate de sodium)	0,5 mg/l
	Ammonium (NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )	4 mg/l
	Baryum (Ba) pour les eaux superficielles	1 mg/l
	Carbone Organique Total (COT)	10 mg/l
	Hydrocarbures dissous ou émulsionnés	1 mg/l
	Nitrates pour les eaux superficielles (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	50 mg/l
	Nitrates pour les autres eaux (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	100 mg/l
	Phénols (indice phénol) (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> OH)	0,1 mg/l
	Zinc (Zn)	5 mg/l
Paramètres concernant les substances toxiques	Arsenic (As)	100 µg/l
	Cadmium (Cd)	5 µg/l
	Chrome total (Cr)	50 µg/l
	Cyanures (CN <sup>-</sup> )	50 µg/l
	Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) Somme des composés suivants : fluoranthène; benzo[b]fluoranthène; benzo[k]fluoranthène, benzo(a)pyrène, benzo (g,h,i)pyrène et indénol[1,2,3-cd] pyrène.	1 µg/l
	Mercure (Hg)	1 µg/l
	Plomb (Pb)	50 µg/l
	Sélénium (Se)	10 µg/l
Pesticides	Par substances individuelles, y compris les métabolites	2 µg/l
	Total	5 µg/l
Paramètres microbiologiques	Entérocoques	10 000/100 ml
	<i>Escherichia coli</i>	20 000/100 ml

\* L'avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments n'est pas requis pour les paramètres notés \*

† La limite de qualité pour le paramètre température ne s'applique pas dans les départements d'outre-mer

## Annexe 2

### Teneurs limites en éléments traces métalliques dans les boues

(Annexe I de l'arrêté du 8 janvier 1998 « fixant les prescriptions techniques applicables aux épandages de boues sur les sols agricoles pris en application du décret n°97-1133 du 8 décembre 1997 relatif à l'épandage des boues issues du traitement des boues issues du traitement des eaux usées »)

ELEMENTS TRACES METALLIQUES	VALEUR LIMITE DANS LES BOUES (en mg/kg MS)	FLUX MAXIMUM CUMULE apporté par les boues en 10 ans (g/m <sup>2</sup> )
Cadmium	10	0,015
Chrome	1000	1,5
Cuivre	1000	1,5
Mercure	10	0,015
Nickel	200	0,3
Plomb	800	1,5
Zinc	3000	4,5
Chrome + cuivre + nickel + zinc	4000	6

### Teneurs limites en composés traces organiques dans les boues

(Annexe I de l'arrêté du 8 janvier 1998 « fixant les prescriptions techniques applicables aux épandages de boues sur les sols agricoles pris en application du décret n°97-1133 du 8 décembre 1997 relatif à l'épandage des boues issues du traitement des boues issues du traitement des eaux usées »)

COMPOSES ORGANIQUES	VALEUR LIMITE DANS LES BOUES (en mg/kg MS)		FLUX MAXIMUM CUMULE apporté par les boues en 10 ans (g/m <sup>2</sup> )	
	Cas général	Epandage sur pâturages	Cas général	Epandage sur pâturages
Total des 7 principaux PCB	0,8	0,8	1,2	1,2
Fluoranthène	5	4	7,5	6
Benzo(b)fluoranthène	2,5	2,5	4	4
Benzo(a)pyrène	2	1,5	3	2

## Annexe 3

### Liste des substances prioritaires à surveiller en sortie de STEP de capacité supérieure à 6000 kg/jour ou STEP susceptibles de les recevoir

*(Annexe V de l'arrêté du 22 juin 2007 relatif à « la collecte, au transport et au traitement des eaux usées des agglomérations d'assainissement ainsi qu'à la surveillance de leur fonctionnement et de leur efficacité, et aux dispositifs d'assainissement non collectif recevant une charge brute de pollution organique supérieure à 1,2 kg/j de DBO<sub>5</sub> »).*

N°d'ordre UE	Nom de la substance
1	Alachlore
5	Diphényléthers bromés
7	C10-13-chloroalcanes
8	Chlorfenvinphos
9	Chlorpyrifos
12	Di(2-éthylhexyl)phtalate
13	Diuron
15	Fluoranthène
19	Isoproturon
24	Nonylphénols
25	Octylphénols
26	Pentachlorobenzène
30	Composés du tribuylétain

## Annexe 4

## Liste des polluants soumis à déclaration pour les STEP &gt; 100 000 EH

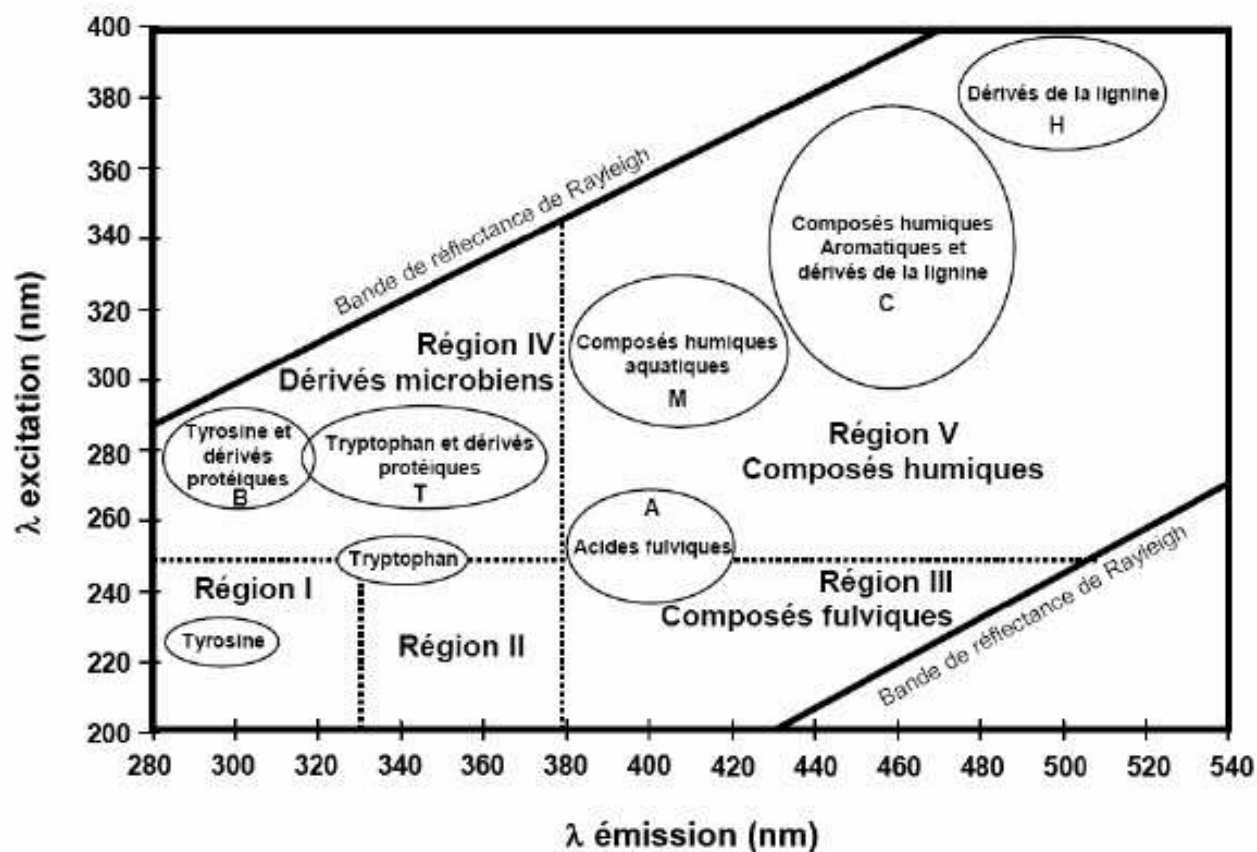
(Annexe II de l'arrêté du 31 janvier 2008 relatif au registre et à la déclaration annuelle des émissions polluantes et des déchets)

NUMÉRO CAS	NUMÉRO SANDRE	POLLUANT (1)	SEUIL DE REJETS		
			Dans l'air (kg/an)	Dans l'eau (kg/an)	Dans le sol (kg/an)
74-82-8		Méthane (CH <sub>4</sub> ).	100 000 (*)	-	-
630-08-0		Monoxyde de carbone (CO).	500 000	-	-
124-38-9		Dioxyde de carbone (CO <sub>2</sub> ) (3).	10 000 000 (*)	-	-
		Hydrofluorocarbones (HFC) (4).	100	-	-
10024-97-2		Protoxyde d'azote (N <sub>2</sub> O).	10 000 (*)	-	-
7664-41-7	1351	Ammoniac (NH <sub>3</sub> ).	10 000	15 000	-
		Composés organiques volatils non méthaniques (COVNM).	30 000	-	-
		Oxydes d'azote (NOx/NO <sub>2</sub> ).	100 000 (*) et (**)	-	-
		Perfluorocarbones (PFC) (5).	100	-	-
2551-62-4		Hexafluorure de soufre (SF <sub>6</sub> ).	20	-	-
		Oxydes de soufre (SOx/SO <sub>2</sub> ).	150 000 (*) et (**)	-	-
	1551	Azote total.	-	50 000	50 000
7723-14-0	1350	Phosphore total.	-	5 000	5 000
		Hydrochlorofluorocarbones (HCFC) (6).	1	-	-
		Chlorofluorocarbones (CFC) (7).	1	-	-
		Halons (8).	1	-	-
		Trifluorure d'azote (NF <sub>3</sub> ).	500	-	-
7429-90-5	1370	Aluminium et composés (exprimés en tant que Al) (9).	-	2 000	2 000
7440-36-0		Antimoine et composés (exprimés en tant que Sb) (9).	10	-	-
7440-38-2	1369	Arsenic et composés (exprimés en tant que As) (9).	20 (**)	5	5
7440-43-9	1388	Cadmium et composés (exprimés en tant que Cd) (9).	10 (**)	0	5
7440-47-3	1389	Chrome et composés (exprimés en tant que Cr) (9).	100 (**)	50	50
18540-29-9	1371	Chrome hexavalent et composés (exprimés en tant que Cr VI) (9).	-	30	30
7440-48-4	1379	Cobalt et composés (exprimés en tant que Co) (9).	5	40	-
7440-50-8	1392	Cuivre et composés (exprimés en tant que Cu) (9).	100 (**)	50	50
7439-89-6	1393	Fer et composés (exprimés en tant que Fe) (9).	-	3 000	3 000
7439-97-6	1387	Mercure et composés (exprimés en tant que Hg) (9).	10 (**)	0	1
7439-96-5	1394	Manganèse et composés (exprimés en tant que Mn) (9).	200 (**)	500	500
7440-02-0	1386	Nickel et composés (exprimés en tant que Ni) (9).	50 (**)	0	20
7439-92-1	1382	Plomb et composés (exprimés en tant que Pb) (9).	200 (**)	0	20
7440-31-5	1380	Etain et composés (exprimés en tant que Sn) (9).	2 000	200	200
7440-32-6	1373	Titane et composés (exprimés en tant que Ti) (9).	-	100	100
7440-66-6	1383	Zinc et composés (exprimés en tant que Zn) (9).	200	100	100
15972-60-8	1101	Alachlore.	-	0	1
309-00-2	1103	Aldrine.	1	0	1
1912-24-9	1107	Atrazine.	-	0	1
57-74-9	1132	Chlordane.	1	1	1
143-50-0	1866	Chlordécone.	1	1	1
470-90-6	1464	Chlorfenvinphos.	-	0	1
85535-84-8	1955	Chloro-alkanes (C10-C13).	-	0	1
2921-88-2	1083	Chlorpyrifos.	-	0	1
50-29-3	1148	Total DDT (y compris les métabolites DDD et DDE).	1	0	1
107-06-2	1161	1,2-dichloroéthane (DCE).	1 000	0	10
75-09-2	1168	Dichlorométhane (DCM).	1 000	0	10
60-57-1	1173	Dieldrine.	1	0	1
330-54-1	1177	Diuron.	-	0	1
115-29-7	1743	Endosulphan (mélange d'isomères).	-	0	1
72-20-8	1181	Endrine.	1	0	1
	1106	Composés organohalogénés (exprimés en tant que AOX) (10).	-	1 000	1 000
76-44-8	1197	Heptachlore.	1	1	1
118-74-1	1199	Hexachlorobenzène (HCB).	10	0	1
87-68-3	1182	Hexachlorobutadiène (HCBD).	0	0	1
608-73-1	1201	1,2,3,4,5,6-hexachlorocyclohexane (HCH).	10	0	-
58-89-9	1203	Lindane.	1	0	1
2385-85-5		Mirex.	1	1	1
		PCDD + PCDF (dioxines + furannes) (en Teq) (11).	0,0001 (**)	0,0001	0,0001
608-93-5	1888	Pentachlorobenzène.	1	0	1
87-86-5	1235	Pentachlorophénol (PCP).	10	0	1
1336-36-3	1032	Biphényles polychlorés (PCB).	0,1	0,1	0,1
122-34-9	1263	Simazine.	-	0	1
127-18-4	1272	Tétrachloroéthylène (PER).	2 000	0	-
56-23-5	1276	Tétrachlorométhane (TCM).	100	0	-
12002-48-1	1630	Trichlorobenzènes (TCB) (tous les isomères).	10	0	-
71-55-6		1,1,1-trichloroéthane (TCE).	100	-	-
79-34-5		1,1,2,2-tétrachloroéthane.	50	-	-
79-01-6	1286	Trichloréthylène (TRI).	2 000	0	-
67-66-3	1135	Trichlorométhane (chloroforme).	500	0	-
8001-35-2	1279	Toxaphène.	1	1	1
75-01-4	1753	Chlorure de vinyle.	1 000	10	10
120-12-7	1458	Anthracène.	50	0	1
71-43-2	1114	Benzène.	1 000	0	200
32536-82-0	2609	Diphénylétthers bromés (PBDE) (12).	0	0	1
25154-52-3	1957	Nonyphénols et éthoxylates de nonylphénol (NP/NPE).	-	0	1
100-41-4	1497	Ethylbenzène.	-	0	200
75-21-8		Oxyde d'éthylène.	1 000	10	10
34123-59-6	1208	Isoproturon.	-	0	1
91-20-3	1517	Naphtalène.	100	0	10
		Composés organostanniques (en tant que Sn total).	-	50	50
117-81-7	1461	Phthalate de di (2-éthylhexyl) (DEHP).	10	0	1
108-95-2	1440	Phénols (en tant que C total) (13).	1 000	20	20
191-24-2	1118	Benzo(g,h,i)pérylène.	-	0	-
207-08-9	1117	Benzo(k)fluoranthène.	0	0	-
193-39-5	1117	Indenol (1,2,3-cd)pyrène.	0	0	-
50-32-8	1115	Benzo(a)pyrène.	0	0	-
205-99-2	1116	Benzo(b)fluoranthène.	0	0	-
		Hydrocarbures.	-	10 000	-
108-88-3	1278	Toluène.	-	0	200
689-73-3	1820	Tributylétain et composés (15).	-	0	1
892-20-6	1779	Triphénylétain et composés (16).	-	1	1
	1325	Carbone organique total (en tant que C total ou DCO/3).	-	50 000	-
		Demande chimique en oxygène (DCO).	-	150 000	-
		Demande biologique en oxygène (DBO <sub>5</sub> ).	-	43 000	-
		Matières en suspension (MES).	-	300 000	-
1582-09-8	1289	Trifluraline.	-	-	1
1330-20-7	1780	Xylènes (17).	-	0	200
16887-00-6	1337	Chlorures (en tant que Cl total).	-	2 000 000	2 000 000
		Chlore et composés inorganiques (en tant que HCl).	10 000 (**)	-	-
1332-21-4	1759	Amiante.	1	1	1
57-12-5	1390	Cyanures (sous forme de CN total).	-	50	50
16984-48-8	1391	Fluorures (en tant que F total).	-	2 000	2 000
		Fluor et composés inorganiques (en tant que HF).	5 000 (**)	-	-
74-90-8		Acide cyanhydrique (HCN).	200	-	-
		Sulfure d'hydrogène (H <sub>2</sub> S).	3 000	-	-
14808-79-8	1338	Sulfates.	-	1 500 000	-
		Particules (PM <sub>10</sub> ).	50 000	-	-
		Poussières totales.	150 000 (*)	-	-
1806-26-4	1920	Octylphénols et éthoxylates d'octylphénol.	-	0	-
206-44-0	1191	Fluoranthène.	-	0	-
465-73-6	1207	Isodrine.	-	0	-
36355-01-8	1922	Hexabromobiphényle.	0,1	0,1	0,1
50-00-0	1702	Aldéhyde formique (formaldéhyde).	1 500	300	-
62-53-3	2605	Aniline.	-	3 000	-
302-01-2		Hydrazine.	100	70	-
67-56-1	2052	Méthanol (alcool méthylique).	20 000	5 000	-
75-07-0		Acétaldéhyde (aldéhyde acétique ou éthanal).	200	-	-
107-13-1		Acrylonitrile.	1 000	-	-
106-99-0		1,3-butadiène.	15 000	-	-
74-87-3		Chlorométhane (chlorure de méthyle).	15 000	-	-
1319-77-3		Crésol (mélanges d'isomères).	200	-	200
123-91-1		1,4-dioxane.	1 000	-	-
106-89-8		Epichlorhydrine (1-chloro-2,3-époxypropane).	100	-	-
75-56-9		Oxyde de propylène (1,2-époxypropane).	2 000	-	-
75-15-0		Sulfate de carbone.	50 000	-	-



## Annexe 5

## Massifs 3D à considérer lors de l'étude de la MOD par spectrofluorescence

(d'après Chen *et al.*, 2003)

## Annexe 6

### Définition et calcul des limites de détection (LD) et de quantification (LQ) selon la procédure proposée par AFNOR

#### - Limite de détection

La limite de détection est la plus petite quantité d'un analyte à doser dans un échantillon, pouvant être détectée et considérée comme différente du blanc (avec une probabilité donnée), mais non nécessairement quantifiée comme valeur exacte. En fait, il faut prendre en compte deux risques :

- le risque  $\alpha$  de considérer la substance présente dans un échantillon alors que sa grandeur est nulle
- le risque  $\beta$  de considérer absente une substance alors que sa grandeur n'est pas nulle

La détermination de la limite de détection s'appuie sur les résultats (exprimés en valeur d'information) des analyses répétitives du blanc (10 analyses). La limite de détection  $LD_{\text{blanc}}$ , exprimée en valeur d'information, s'obtient ainsi :

$$LD_{\text{blanc}} = \tilde{y}_{\text{blanc}} + k_d s_{\text{blanc}}$$

où :  $\tilde{y}_{\text{blanc}}$  est la valeur d'information moyenne du blanc,  $s_{\text{blanc}}$  l'écart-type des valeurs d'information sur le blanc et  $k_d$  un coefficient fonction des risques  $\alpha$  et  $\beta$

$$k_d = (t_{1-\alpha} + t_{1-\beta}) \sqrt{2} = 2\sqrt{2} t_{1-\alpha} \text{ (si on considère } t_{1-\alpha} \text{ et } t_{1-\beta} \text{ identiques)}$$

où :  $t_{1-\alpha}$  est le risque unilatéral lu dans la table de Student en fonction du degré de liberté et du niveau de signification  $\alpha$

Ensuite, la concentration correspondant à la  $LD_{\text{blanc}}$  est calculée en utilisant l'équation de la droite d'étalonnage.

**- Limite de quantification**

La limite de quantification est la plus petite grandeur d'un analyte à doser dans un échantillon pouvant être déterminée quantitativement dans des conditions expérimentales décrites dans la méthode avec une variabilité définie (coefficient de variation déterminé). La détermination de la limite de quantification s'appuie également sur les résultats (exprimés en valeur d'information) des analyses répétitives du blanc. La limite de quantification est considérée comme étant égale à la grandeur moyenne du blanc, à laquelle on ajoute 10 fois l'écart type obtenu sur le blanc. La limite de quantification  $LQ_{\text{blanc}}$  exprimée en valeur d'information s'obtient ainsi :

$$LQ_{\text{blanc}} = \tilde{y}_{\text{blanc}} + 10 s_{\text{blanc}}$$

Ensuite, la concentration correspondant à la  $LQ_{\text{blanc}}$  est calculée en utilisant l'équation de la droite d'étalonnage.

## Annexe 7

*Ce travail de thèse a fait l'objet de différentes publications, communications orales et par voie d'affiche, ainsi que l'objet de dépôt de brevets :*

### ↪ PUBLICATIONS

F. Robert-Peillard, E. Palacio-Barco, Y. Dudal, B. Coulomb, J.-L. Boudenne. ***Alternative spectrofluorimetric determination of short-chain volatile fatty acids in aqueous samples.*** Analytical Chemistry, 2009, 81(8), 3063-3070.

E. Palacio-Barco, F. Robert-Peillard, B. Coulomb, J.-L. Boudenne. ***On-line analysis of volatile fatty acids in anaerobic treatment processes.*** Analytica Chimica Acta, 2010, 668(1), 74-79.

### ↪ COMMUNICATIONS ORALES ET PAR VOIE D'AFFICHE

F. Robert-Peillard, E. Palacio-Barco, B. Coulomb, J.-L. Boudenne. ***Development of a fluorescence-based microplate method for the determination of Volatile Fatty Acids in anaerobically-digested and sewage sludges.*** 3<sup>rd</sup> Euchems Chemistry Congress, 29 August-2 September 2010 Nürnberg, Allemagne (Oral).

E. Palacio-Barco, F. Robert-Peillard, J.-L. Boudenne, B. Coulomb. ***On-line analysis of VFA's in anaerobic treatment processes.*** XI<sup>th</sup> International conference on Flow Analysis. 14-18 September 2009, Pollentia, Espagne (Oral).

E. Palacio-Barco, F. Robert-Peillard, Y. Dudal, B. Coulomb, J.-L. Boudenne. ***Semi direct fluorimetric characterization of dissolved organic matter: application to the determination of VFA and thiol compounds.*** Séminaire « Matières Organiques et Environnement », 25 - 28 janvier 2009, Sainte-Maxime, France (Oral).

E. Palacio-Barco, F. Robert-Peillard, Y. Dudal, B. Coulomb, J.-L. Boudenne. ***Spectrofluorimetric detection of glutathione and thiol-containing compounds in various environmental matrices.*** 3<sup>rd</sup> International Meeting on Environmental Biotechnology and Engineering, 21-25 September 2008, Palma de Mallorca, Espagne (Poster).

### ↪ BREVETS

J.-L. Boudenne, B. Coulomb, F. Robert-Peillard, E. Palacio-Barco, Y. Dudal. ***Kit de détection de groupements fonctionnels carboxyliques, thiols et amines.*** N° FR 2934373, publié le 29 janvier 2010.

J.-L. Boudenne, B. Coulomb, F. Robert-Peillard, E. Palacio-Barco. ***Kit de détection de groupements fonctionnels carboxyliques.*** N° FR10 00340, brevet déposé le 29 janvier 2010.