



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

1360086448

96 INPL 070N

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE
ECOLE NATIONALE SUPERIEURE DES INDUSTRIES CHIMIQUES

[M] 1996 DARNE, R.

THESE

Présentée en vue de l'obtention du titre de

DOCTEUR

de

L'INPL

Service Commun de la Documentation
INPL
Nancy-Brabois

par

Raphaëlle DARNE

Maître ès Physique-Chimie

**ETUDE PHOTOPHYSIQUE
DES TRANSFERTS PARIETAUX**

Soutenue publiquement le 1^{er} Juillet 1996 devant la commission d'examen

Rapporteurs : Jean-Pierre GOURE

André REVILLON

Membres du Jury : Noël MIDOUX

Marie-Christiane CARRE

Marie-Laure VIRIOT

Jean-Claude ANDRE

à David et à Laurine

à ma mère



REMERCIEMENTS

Le titre peu évocateur de mon sujet de recherche allait devenir pour moi le *leitmotiv* de ces années passées au laboratoire. Mais comment ne pas y associer ceux qui m'ont aidée et soutenue pendant ce temps ?

J'aimerais donc remercier Jean-Claude ANDRE pour m'avoir proposé ce sujet de recherche et pour m'avoir accueillie au sein du GRAPP dont il était le Directeur.

Je tiens à exprimer ma plus profonde reconnaissance à Marie-Laure VIRIOT, ma Directrice de Recherche au GRAPP qui a suivi et guidé mon travail et qui a su au moment opportun me donner le "petit coup de pouce" indispensable à l'achèvement d'un travail.

Je souhaite remercier également Noël MIDOUX, mon Directeur de Recherche au LSGC avec qui mes rapports furent courts mais très enrichissants.

J'adresse mes sincères remerciements à Marie-Christiane CARRE, pour ses précieux conseils en chimie organique et pour avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie également Jean-Pierre GOURE et André REVILLON pour le temps consacré et l'attention portée à l'examen de ce mémoire et pour leur jugement en tant que rapporteurs.

Tout au long de ces années, nombreux sont ceux dont j'ai reçu aide, conseil et soutien. Ne leur réserver ici qu'une longue énumération ne serait pas leur rendre l'hommage et l'amitié que je leur porte. Qu'ils sachent donc que, chacun d'eux, je ne l'ai pas oublié dans mes remerciements, au GRAPP ou au DCPR, dans les laboratoires, les secrétariats et les ateliers. A chacun d'eux, je dois d'avoir pu mener à bien ce travail de recherche.

SOMMAIRE GENERAL

INTRODUCTION	1
CHAPITRE I : Analyses de surfaces modifiées - Etat des connaissances	6
I.1. LES MODES DE MODIFICATION DE LA SURFACE	10
I.2. CARACTERISATION DE LA SURFACE ACTIVEE	18
I.3. CARACTERISATION DE LA SURFACE SILANISEE	22
I.4. CARACTERISATION DE LA SURFACE FONCTIONNALISEE	36
CHAPITRE II : Fixation du fluorophore sur la surface : greffage chimique et étude photophysique	42
II.1. OBJECTIF DE L'ETUDE	44
II.2. IMMOBILISATION	46
II.3. ANALYSE QUALITATIVE DE LA SURFACE GREFFEE	54
II.4. ANALYSE QUANTITATIVE DE LA SURFACE GREFFEE	66
II.5. MODELISATION DU PHENOMÈNE DE DESORPTION	74
II.6. ETUDE DE LA STABILITE DU GREFFAGE DANS L'EAU	80
II.7. CONCLUSION	94
CHAPITRE III : Mise en œuvre du capteur	96
III.1. OBJECTIF DE L'ETUDE	98
III.2. CONFIGURATION DU CAPTEUR	100
III.3. DROITE DE STERN-VOLMER	106
III.4. MISE EN ŒUVRE DU CAPTEUR	116
CHAPITRE IV : Perspectives et conclusion	126
IV.1. AMELIORATION DU CAPTEUR	128
IV.2. PERSPECTIVES	132
IV.3. CONCLUSION	136
ANNEXES	138
RECAPITULATIF DES FIGURES ET TABLEAUX	194
LISTE DES ABREVIATIONS ET SYMBOLES	204
PRODUITS ET SOLVANTS UTILISES	208
BIBLIOGRAPHIE	212

SOMMAIRE DETAILLE

INTRODUCTION	1
CHAPITRE I	6
I.1. LES MODES DE MODIFICATION DE LA SURFACE	10
<i>I.11. Hydroxyles de surface</i>	<i>10</i>
I.111. Les différentes formes de silanols	11
I.112. Activation	13
a) Traitement thermique	13
b) Traitement chimique	13
b ₁) Acides, bases et solvants organiques	13
b ₂) Silane	14
c) Traitement aux ultrasons	14
<i>I.12. Modification par des silanes</i>	<i>14</i>
I.121. Schéma réactionnel	14
I.122. La liaison siloxane	15
a) Un seul groupe réactif X (type XSiR ₃)	15
b) Plusieurs groupes réactifs (type X ₂ SiR ₂ ou X ₃ SiR)	16
I.123. Conditions expérimentales	16
<i>I.13. Couplage avec d'autres molécules</i>	<i>17</i>
I.2. CARACTERISATION DE LA SURFACE ACTIVEE	18
<i>I.21. Analyse qualitative de la surface activée</i>	<i>18</i>
I.211. Etude par spectrométrie photoélectronique à rayons X (XPS ou ESCA)	18
I.212. Etude par bombardement atomique rapide (FAB)	20
I.213. Hétérogénéité de la surface	20
<i>I.22. Analyse quantitative de la surface activée</i>	<i>21</i>
I.3. CARACTERISATION DE LA SURFACE SILANISEE	22
<i>I.31. Analyse qualitative de la surface silanisée</i>	<i>22</i>
I.311. Influence de l'eau	22
a) Silanisation dans un solvant	22
b) Silanisation en milieu aqueux	23
c) Méthodes d'analyse	25
I.312. Géométrie du dépôt silane	25
a) Silanisation dans un solvant	25
b) Silanisation en milieu aqueux	25
c) Méthodes d'analyse	26
I.313. Stabilité de la surface silanisée	27
a) Origines de l'instabilité	27
a ₁) L'hydrolyse	27
a ₂) La désorption de molécules silane faiblement liées	27
a ₃) La recombinaison des molécules secondaires	27
b) Remèdes	28
c) Méthodes d'analyse	28
I.314. Influence du catalyseur	29
a) Le chlorure de para-toluènesulfonyle	29
b) Les amines	29

<i>I.32. Analyse quantitative de la surface silanisée</i>	32
I.321. Détermination de la concentration surfacique des silanes	32
I.322. Les valeurs de la littérature et leurs méthodes de détermination	33
I.323. Détermination de l'épaisseur du dépôt silane	34
I.4. CARACTERISATION DE LA SURFACE FONCTIONNALISEE	36
<i>I.41. Analyse qualitative de la surface fonctionnalisée</i>	36
I.411. Phénomène d'adsorption	36
I.412. Identification des sources principales d'adsorption et techniques pour y remédier	36
<i>I.42. Analyse quantitative de la surface fonctionnalisée</i>	37
I.421. Détermination de la concentration de surface en molécules fonctionnelles	37
a) Calcul de la concentration théorique	37
a1) Modèle simplifié	38
a2) Modèle plus élaboré	38
b) Méthodes de détermination expérimentale	39
I.422. Cinétique de la désorption	40
 CHAPITRE II	 42
II.1. OBJECTIF DE L'ETUDE	44
II.2. IMMOBILISATION	46
<i>II.21. Conditions expérimentales</i>	46
II.211. Choix initial de la surface	46
II.212. Activation	47
II.213. Silanisation	47
a) Dispositif expérimental	48
b) Conditions expérimentales et notations	48
b1) Solvant	48
b2) Catalyseurs	48
b3) Notations	49
II.214. Couplage	50
a) Principe	50
b) Conditions expérimentales	52
<i>II.22. Adsorption physique</i>	52
II.3. ANALYSE QUALITATIVE DE LA SURFACE GREFFEE	54
<i>II.31. Objectif</i>	54
<i>II.32. Analyse par spectroscopie IR</i>	55
II.321. Conditions expérimentales et mode opératoire	55
II.322. Résultats	55
<i>II.33. Analyse par fluorimétrie</i>	57
II.331. Conditions expérimentales et mode opératoire	57
a) Comparaison entre APB libre et greffé	57
b) Mesure de l'intensité en milieu sec	57
II.332. Résultats et discussion	57
<i>II.34. Analyse par microscopie en fluorescence</i>	60
II.341. Conditions expérimentales et mode opératoire	60
II.342. Résultats	60

II.35. Analyse par microscopie à force de cisaillement	61
II.351. Conditions expérimentales et mode opératoire	61
a) Cas du suivi de la modification	61
b) Cas des différents types de silanisation	61
II.352. Résultats	62
a) Suivi de la modification	62
b) Etude de différents types de silanisation	62
b ₁) Silanisation a	62
b ₂) Silanisation e	62
b ₃) Silanisation ha	62
b ₄) Silanisation c ₁ a	64
b ₅) Silanisation c ₂ e	64
II.4. ANALYSE QUANTITATIVE DE LA SURFACE GREFFEE	66
II.41. Objectif	66
II.42. Concentration surfacique théorique	66
II.43. Concentration surfacique expérimentale	67
II.431. Principe	67
II.432. Désorption	67
a) Protocole expérimental	67
b) Analyse fluorimétrique	67
II.433. Dégreffage	68
a) Protocole expérimental	68
b) Analyse fluorimétrique	68
II.434. Résultats	69
a) Désorption	69
b) Dégreffage	70
II.435. Conclusions	70
a) Type de surface	72
b) Type de silanisation	72
II.5. MODELISATION DU PHENOMÈNE DE DESORPTION	74
II.51. Objectif	74
II.52. Détermination du modèle	74
II.53. Résultats et conclusions	76
II.531. Résultats	76
a) Cinétique du premier ordre	76
b) Cinétiques d'ordres zéro et un	77
II.532. Conclusions	77
II.6. ETUDE DE LA STABILITE DU GREFFAGE DANS L'EAU	80
II.61. Objectif	80
II.62. Stabilité dans l'eau en absence d'écoulement	80
II.621. Conditions expérimentales et mode opératoire	81
a) Greffage	81
b) Analyse	81
II.622. Résultats	81
II.63. Analyse en discontinu	83
II.631. Conditions expérimentales et mode opératoire	83
II.632. Résultats	84
II.633. Discussion	88

II.64. Analyse en continu	88
II.641. Analyse de l'eau d'écoulement	89
a) Conditions expérimentales et mode opératoire	89
a1) Greffage	89
a2) Analyse	89
b) Résultats	90
c) Discussion	91
II.642. Analyse de la surface pendant l'écoulement	91
a) Conditions expérimentales et mode opératoire	91
a1) Greffage	91
a2) Montage expérimental	91
a3) Mode opératoire	92
b) Résultats	92
c) Conclusion	93
II.7. CONCLUSION	94
CHAPITRE III	96
III.1. OBJECTIF DE L'ETUDE	98
III.2. CONFIGURATION DU CAPTEUR	100
III.21. Schéma	100
III.22. Partie 1 : système d'excitation	101
III.23. Partie 2 : guide de lumière	101
III.231. Caractéristiques des fibres optiques	101
III.232. Raccordements aux parties 1 et 5	103
a) Entrée du faisceau laser	103
b) Sortie vers la partie 5	103
III.233. Contact avec la surface modifiée	103
III.24. Parties 3 + 4 : partie active	103
III.241. Surface modifiée par le fluorophore (partie 4)	103
a) Type de surface et géométrie	103
b) Protocole de modification	104
III.242. Système de maintien de la surface (4)	104
III.25. Partie 5 : Système d'analyse de l'émission de fluorescence	105
III.3. DROITE DE STERN-VOLMER	106
III.31. Théorie	106
III.32. Objectif	108
III.33. Utilisation d'un consommateur d'oxygène	109
III.331. Conditions expérimentales	109
a) Greffage de la surface	109
b) Mode opératoire	109
III.332. Résultats et conséquences	110
III.333. Conclusion	111
III.34. Dégazage par l'azote	111
III.341. Conditions expérimentales et mode opératoire	111
a) Conditions expérimentales et appareils de mesure	111
b) Mode opératoire	112
III.342. Résultats	112
III.343. Conclusions	113

III.4. MISE EN ŒUVRE DU CAPTEUR	116
<i>III.41. Conditions expérimentales et matériel</i>	<i>116</i>
<i>III.42. Mode opératoire</i>	<i>116</i>
<i>III.43. Réglages</i>	<i>117</i>
<i>III.44. Résultats</i>	<i>117</i>
III.441. Réglages	117
III.442. Résultats	117
a) Spectres d'émission de fluorescence	117
b) Variation d'intensité de fluorescence	119
<i>III.45. Exploitation des résultats</i>	<i>120</i>
<i>III.46. Discussion et conclusion</i>	<i>124</i>
CHAPITRE IV	126
IV.1. AMELIORATION DU CAPTEUR	128
<i>IV.11. Données imposées au départ</i>	<i>128</i>
IV.111. Fluorophore	128
IV.112. Excitation	128
<i>IV.12. Améliorations</i>	<i>129</i>
IV.121. Source excitatrice	129
IV.122. Fibres optiques	130
IV.123. Analyse de la fluorescence	130
a) Augmentation de la sensibilité de l'appareil	130
b) Changement de configuration	130
IV.2. PERSPECTIVES	132
<i>IV.21. Environnement du capteur</i>	<i>132</i>
IV.211. Dans l'air	132
IV.212. Dans un milieu organique	132
<i>IV.22. Détection des bulles de gaz</i>	<i>133</i>
IV.3. CONCLUSION	136
ANNEXE I	138
ANNEXE II	148
ANNEXE III	154
AIII.1. LA FLUORESCENCE	156
<i>AIII.11. Concepts de base</i>	<i>156</i>
<i>AIII.12. Désactivations radiatives : la fluorescence et la phosphorescence</i>	<i>156</i>
<i>AIII.13. La fluorescence : facteurs d'influence</i>	<i>157</i>
AIII.131. Influence du solvant	157
AIII.132. Influence du pH	157
AIII.133. Influence de la viscosité	157
AIII.134. Influence des solutés (inhibition de fluorescence)	158
AIII.135. Influence de la température	158

<i>AIII.14. Excimères intermoléculaires</i>	158
<i>AIII.15. Mesure de la fluorescence</i>	159
AIII.2. L'ACIDE 4-(1-PYRENYL)BUTYRIQUE	162
<i>AIII.21. Courbe d'étalonnage APB/DMF</i>	163
<i>AIII.22. Courbe d'étalonnage APB/NaOH</i>	165
ANNEXE IV	166
ANNEXE V	190
RECAPITULATIF DES FIGURES ET TABLEAUX	194
Liste des abreviations et symboles	204
PRODUITS ET SOLVANTS UTILISES	208
BIBLIOGRAPHIE	212

INTRODUCTION

A l'heure où l'on traque "le point" de rendement d'un procédé, quand la constance d'une production conditionne la vente d'un produit, ou quand la qualité et l'environnement dictent la marche à suivre, la connaissance des phénomènes de mélange peut être le point clé de l'optimisation d'une chaîne de production.

Devant ce constat, se sont développés des capteurs utilisant des techniques variées et capables de fournir les informations attendues (quantité de produits, qualité du mélange, etc.). Ainsi, les milieux réactionnels les plus divers se sont vus "décortiqués", analysés, modélisés, etc.

Une des mesures les plus intéressantes semble être la capacité de mélange de deux produits quelconques, qu'il s'agisse de deux gaz, d'un liquide et un gaz, ou de deux liquides. Cette information peut être connue par la détermination du coefficient de transfert entre les deux parties. Cette mesure dans le cas d'un mélange liquide-gaz doit être très rapide (quelques secondes au plus). A l'heure actuelle, peu d'outils sont capables d'offrir un temps de réponse assez court.

C'est dans cette optique que ce travail de recherche a pris forme au Département de Chimie Physique des Réactions et plus particulièrement dans le Groupe de Recherches et Applications en Photophysique et Photochimie en association avec le Laboratoire des Sciences du Génie Chimique de l'ENSIC à Nancy. En effet, l'idée de départ a été d'utiliser la fluorescence pour mesurer ces phénomènes. Tout à fait novatrice dans la mesure des transferts pariétaux, la fluorescence ne l'est pas en ce qui concerne les études de mélanges. En effet, par exemple un travail de recherche précédent [Vacus, 1991] avait permis de mettre au point une méthode optique pour la mesure de concentrations locales en phase liquide dans le cas du mélange dans une cuve agitée. La chimiluminescence, quant à elle, a aussi été utilisée pour mesurer le transfert de matière à l'interface gaz-liquide [Grandclaude, 1990].

Nous avons donc mis à profit l'inhibition de fluorescence par l'oxygène. En effet, la constante de temps d'un tel phénomène est de l'ordre de quelques secondes. Ainsi, en réalisant un capteur possédant des molécules fluorescentes réagissant à la quantité d'oxygène présente, nous pourrions obtenir des indications sur le transfert de l'oxygène gazeux dans une phase liquide.

Le principe du capteur est schématisé sur la figure 1. Si le milieu biphasique est turbulent, nous pourrions étudier les phénomènes de transfert de l'oxygène à travers la couche limite formée au niveau de la paroi du capteur. Pour que le fluorophore soit fixé fortement, nous avons choisi de le greffer à la paroi par une liaison chimique covalente.

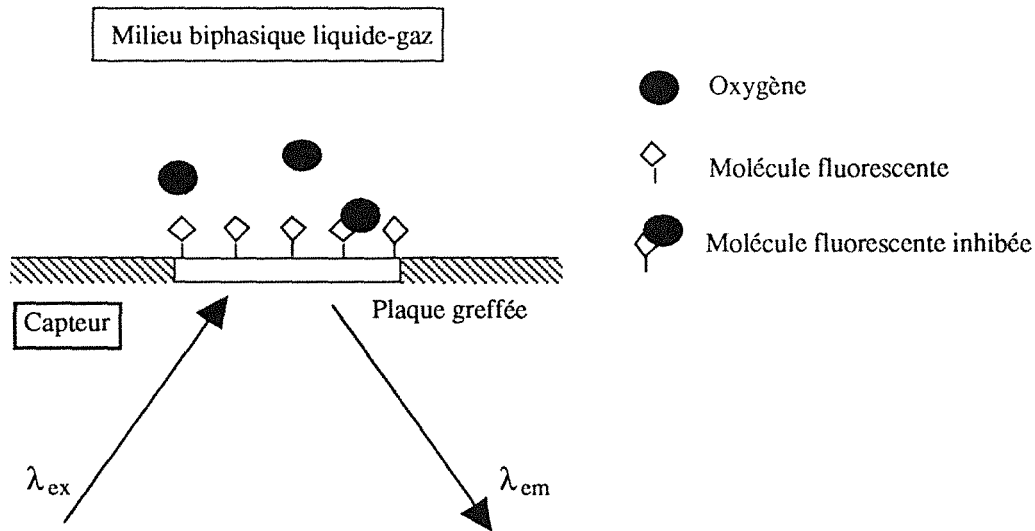


Figure 1.
Schéma de principe du capteur.

La figure 2 correspond à la forme prévue pour le signal de fluorescence en fonction du temps, qui se décompose en trois parties :

- partie A : l'écoulement du fluide sans oxygène sur la surface du capteur n'a aucune incidence sur la réponse du fluorophore. L'intensité de fluorescence $I(t)$, réponse temporelle à l'excitation, est constante et maximale,
- partie B : l'ajout de molécules inhibitrices (*i.e.* oxygène) induit une diminution rapide de la fluorescence lorsque ces molécules ont traversé la couche limite (phénomène dépendant de la constante de diffusion dans la couche limite). La disparition de l'inhibiteur permet de revenir à l'intensité de fluorescence initiale,
- partie C : la réponse à l'excitation est à nouveau constante, jusqu'à la prochaine arrivée d'inhibiteur au travers de la couche limite.

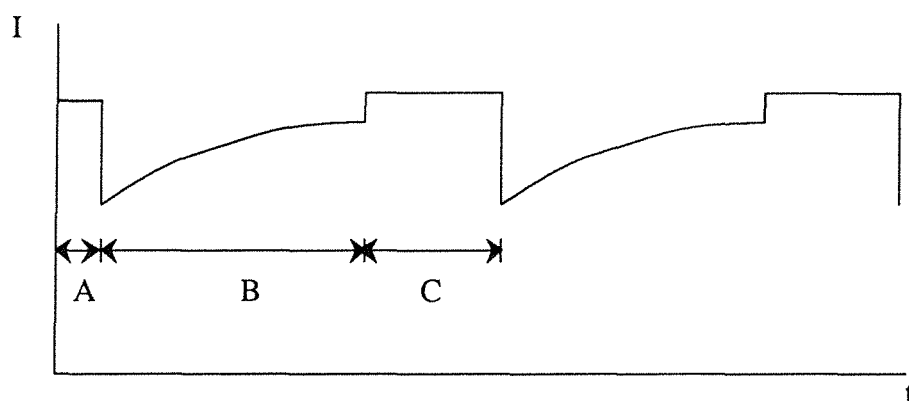


Figure 2.
Forme attendue pour la réponse du capteur :
intensité de fluorescence en fonction du temps.

Pour réaliser cet appareil de mesure, nous avons choisi de greffer l'acide 4-(1-pyrényl)butyrique (APB) comme molécule fluorescente à cause de sa forte inhibition par l'oxygène. La connaissance de l'état de la surface après un tel traitement est alors primordiale. Ainsi, notre premier chapitre est axé autour des analyses de l'état de surface après différents types de modifications.

Le choix du mode de fixation du fluorophore a été guidé à la fois par les résultats publiés par plusieurs auteurs pour des surfaces en silice et par les méthodes développées au GRAPP.

La liaison chimique ainsi obtenue doit être stable sous l'eau pour permettre la mesure. Notre deuxième chapitre sera donc consacré à la réalisation du greffage, à l'analyse de la surface et à l'étude de sa stabilité sous l'eau.

Le troisième chapitre est relatif aux différents tests effectués pour la mise en œuvre du capteur dans son environnement final.

Le quatrième et dernier chapitre permet d'envisager les perspectives d'utilisation du capteur ainsi que les améliorations éventuelles.

Avant tout, il nous a semblé important de préciser le sens accordé aux mots utilisés par la suite dans le texte. Ainsi, nous avons choisi d'appeler *greffage* la suite d'opérations conduisant à l'obtention d'une liaison chimique covalente entre la partie fluorescente et la surface. Au cours de ce traitement, il peut par ailleurs se former des interactions physiques par *adsorption* des molécules sur la surface. L'ensemble de ces deux phénomènes (*greffage* et *adsorption*) conduit à la modification de la surface. Ainsi, une molécule sera *fixée* si elle est *greffée* (liaison chimique covalente) ou si elle est *adsorbée* (liaison faible - association intermoléculaire).

CHAPITRE I

Analyses de surfaces modifiées - Etat des connaissances

Les surfaces en silice modifiées par des molécules organiques trouvent des applications dans divers domaines allant des matériaux composites renforcés par des fibres de silice, aux phases stationnaires de la chromatographie, en passant par leurs applications dans la réalisation de capteurs. La littérature sur la silice et les interactions molécules organiques-surface est vaste et reflète la sélectivité qui peut être obtenue en fonction du traitement de la silice nue et des conditions de réaction. Ceci a conduit à la création de silices modifiées pour des usages spécifiques, mais aussi à une certaine confusion en ce qui concerne les facteurs influençant la réaction et la surface résultante. Beaucoup d'auteurs ont cherché quels étaient les effets des conditions de réaction en étudiant les propriétés de telles surfaces. Cette approche peut démontrer l'efficacité de traitements de surface variés, mais elle n'apporte aucun éclaircissement quant aux phénomènes chimiques mis en jeu pour obtenir les caractéristiques de surface désirées. Cette ignorance a conduit à émettre des suppositions sur les structures et sur les qualités du dépôt sur la surface qui peuvent être vérifiées par différentes techniques d'analyse.

Ce premier chapitre ne donnera donc pas une liste des méthodes de greffage (conditions opératoires, surfaces utilisées, réactifs, etc.) mais plutôt un aspect des surfaces à travers les différentes techniques d'investigation.

I.1. LES MODES DE MODIFICATION DE LA SURFACE

I.1.1. Hydroxyles de surface

La plupart des propriétés d'adsorption et d'adhésion et des propriétés chimiques et catalytiques de la silice sont liées à la chimie et la texture de la surface.

En 1934, Hofmann et al. postulent l'existence de groupes silanol (Si-OH) sur la surface en silice. A présent, il est admis que les atomes de silice de la surface tendent à compléter leur configuration tétraédrique et en milieu aqueux leur valence libre devient saturée par des groupes hydroxyle formant ainsi des silanols de surface.

Les groupes silanol sont formés sur la silice au cours de sa synthèse durant la phase de polymérisation par condensation des $\text{Si}(\text{OH})_4$ ou celle de réhydratation dans l'eau ou dans des solutions aqueuses, de la silice déshydroxylée thermiquement (figure (I).1).

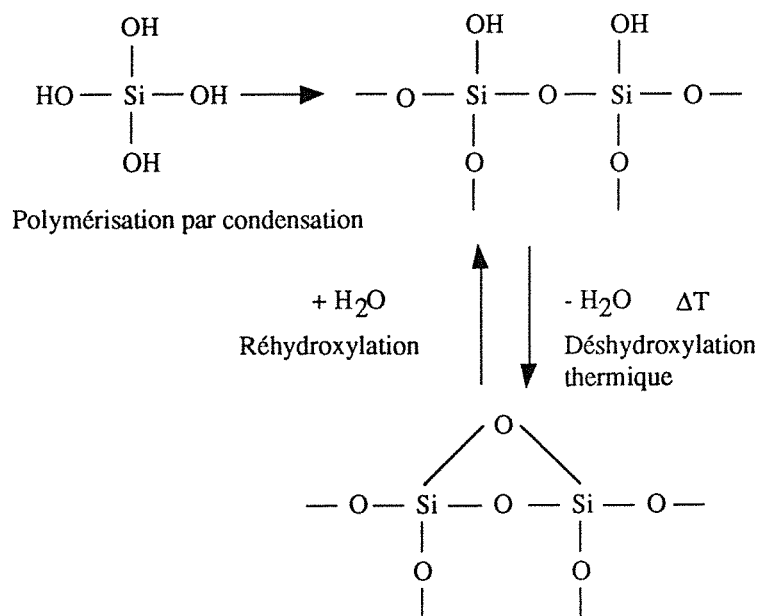


Figure (I).1.
Obtention des silanols de surface.

Les groupes silanol sur la surface en silice peuvent être classés suivant leur nature, la multiplicité des sites et le type d'association [Legrand et al., 1990] et ils ne diffèrent que par leur degré d'hydratation.

Ils peuvent être caractérisés par des analyses thermogravimétriques [Iler, 1979], la spectroscopie vibrationnelle [White et Nair, 1990] et la résonance magnétique nucléaire [Wijnen et al., 1991]. Les informations concernent la concentration de surface, les interactions de type liaison hydrogène entre les groupes hydroxyle et la distribution des espèces Si-OH et Si(OH)₂ sur la surface.

I.111. Les différentes formes de silanols

Un silanol isolé a une fonction -OH suffisamment éloignée du groupe hydroxyle voisin pour qu'aucune liaison hydrogène n'intervienne (distance supérieure à 0,33 nm). Un site de ce type est désigné par Q³ dans la nomenclature RMN Qⁿ où n est le nombre d'oxygènes liés à l'atome de silicium central. En spectroscopie IR, ce silanol isolé présente une bande autour de 3750 cm⁻¹ [Hair, 1967 ; McDonald, 1958].

Les silanols géminaux sont des groupes silanediol localisés sur des sites de type Q². Leur existence a été confirmée par la résonance magnétique nucléaire de ²⁹Si par Maciel et Sindorf, 1980 (technique "Cross-Polarization Magic Angle Spinning Nuclear Magnetic Resonance" - CP MAS NMR).

La distance OH---O peut être suffisamment petite pour qu'il y ait association entre deux groupes Si-OH voisins par liaison hydrogène. Dans ce cas, ce sont des silanols vicinaux ou associés. La liaison hydrogène est à l'origine d'une réduction de la fréquence de vibration dont l'amplitude dépend de la force de la liaison hydrogène et donc de la distance OH---O. La bande du spectre IR correspondant se situe à environ 3660 cm⁻¹.

La figure (I).2 regroupe les différentes formes de silanols possibles. Cependant, la quantité de silanols à la surface reste généralement inférieure à celle attendue pour une surface complètement hydroxylée. Ainsi, une partie de la surface en silice est constituée de siloxanes (figure (I).3). Ils proviennent de la condensation de deux groupes silanol. Ceci se produit à température élevée, lors de la fabrication de la silice. En effet, la direction des orbitales hybrides *sp*₃ utilisées pour former les liaisons des groupes hydroxyle avec les atomes de la surface est fixe puisque les atomes de silicium sont liés dans le solide par deux ou trois liaisons siloxane. Par conséquent, une liaison siloxane ne peut se former que si le réseau SiO₂ devient suffisamment mou à haute température pour permettre une réorientation du tétraèdre. Celle-ci commence à approximativement 450°C et est pratiquement complète à 850°C.

Les silanols sont les centres principaux d'adsorption de molécules d'eau quel que soit le type de configuration dans laquelle ils se trouvent. Ils donnent donc à la silice un fort pouvoir desséchant.

La modification de la surface, par l'intermédiaire de ces silanols, est à la base de l'utilisation de la silice en chimie analytique et dans les procédés de chromatographie.

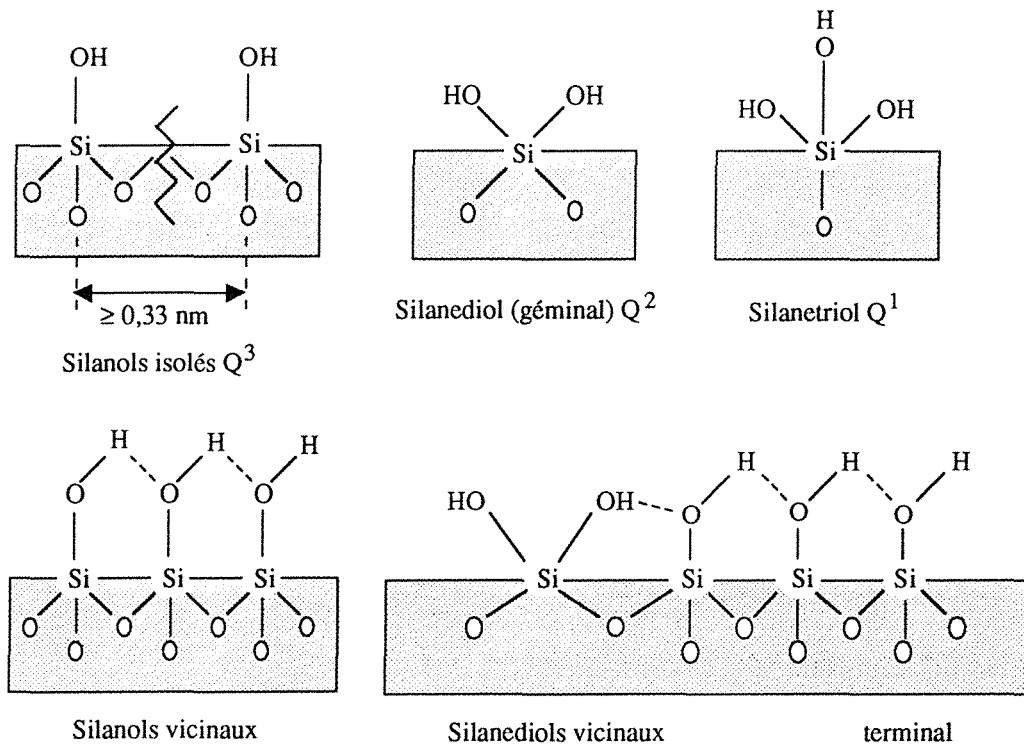


Figure (I).2.
Types de silanols possibles sur la surface en silice.

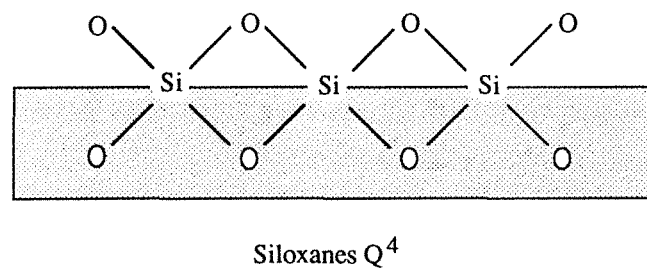


Figure (I).3.
Condensation des groupes silanol pour donner des ponts siloxane.

I.112. Activation

Pour obtenir un rendement maximal de liaisons lors de la modification, il faut que la surface soit recouverte avec un maximum de fonctions -OH. La première étape déterminante concerne l'**activation des sites réactifs (création)**.

a) Traitement thermique

La déshydratation de la surface par un traitement thermique dépend de la concentration en silanols de surface (nature de la surface) et de la température. Dans la littérature, il apparaît plusieurs domaines :

- jusqu'à 200°C, l'eau physisorbée peut être extraite (températures optimales différentes suivant le type de silices utilisées),
- entre 200 et 800°C, des transformations internes interviennent (réarrangement des tétraèdres) avec début de formation de ponts siloxane,
- au-dessus de 800°C, il y a coexistence de siloxanes et de silanols.

b) Traitement chimique

b1) Acides, bases et solvants organiques

La liaison hydrogène qui existe entre deux silanols peut être rompue si l'un des oxygènes est protoné par l'action d'un acide fort. Ceci est largement utilisé pour les fibres optiques, ainsi que pour tous les capteurs destinés à des utilisations en biologie.

Ainsi, acides chlorhydrique [Ogasawara et al., 1992], nitrique [Claudon et al., 1991 ; Menawat et al., 1984 ; Petrea et al., 1988 ; Riedo et al., 1978 ; Tromberg et al., 1987 ; Williamson et al., 1989 ; Wirth et Fatunmbi, 1992 et 1993], sulfochromique [Billard et al., 1991 ; Duvault et al., 1990 ; Kulp et al., 1987 ; Kumar et al., 1994 ; Lin et al., 1988] et sulfurique [Sutherland et al., 1984] sont amplement utilisés, seuls ou couplés. L'utilisation de l'acide fluorhydrique [Bright et al., 1990 ; Urbano et al., 1984], acide qui détériore la surface par solubilisation, est moins répandue. Pour que l'action acide soit plus efficace, elle est souvent réalisée à chaud.

Plus rares sont les utilisations de bases comme l'hydroxyde de sodium concentré à température ambiante [Wrighton et al., 1978] ou dilué et chauffé à reflux [Aue et Hastings, 1969].

Il arrive que soit associé au traitement acide un "dégraissage" des surfaces par des solvants organiques comme l'acétone et le trichloroéthylène [Bataillard et al., 1988 ; Duvault et al., 1990], l'heptane [Mimms et al., 1977], la méthyléthylcétone [Menawat et al., 1984].

b2) Silane

C'est une méthode peu utilisée, décrite par Marshall et al., 1986. L'activation de la surface en silice est réalisée par action de faibles quantités de triméthylchlorosilane. Les auteurs enregistrent une augmentation de l'efficacité des phases stationnaires greffées à la suite de cette activation. Ceci serait attribué à la réaction initiale des agents triméthylsilylés avec des silanols réunis en "clusters". La désactivation partielle de ces "clusters", par suite de leur liaison avec le silane, engendrerait une distribution plus homogène des silanols réactifs sur la surface.

c) *Traitement aux ultrasons*

Il semble que peu d'auteurs appliquent cette méthode [Sutherland et al., 1984 ; Wei et al., 1993]. L'action des ultrasons est d'enlever les impuretés [Le Grange et al., 1993] et les molécules adsorbées.

La réaction n'a pas obligatoirement lieu à partir des silanols. Par exemple, Dubois et Zegarsky (1993) font agir un agent de couplage de type alkylalkoxysilane (méthyltriéthoxysilane et méthyltriméthoxysilane) directement avec les siloxanes de la surface (gel de silice Cab-O-Sil) sans faire intervenir les silanols restants. La réaction a lieu à 330 K.

Reuter et al. (1994) modifient les propriétés initiales de la surface (silice finement dispersée Aerosil 300) en transformant directement les Si-OH (par chauffage à 1273 K en phase gazeuse) en Si-H.

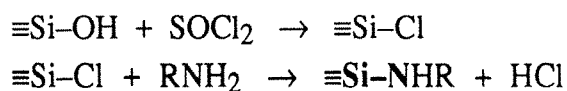
1.12. Modification par des silanes

En règle générale, le silane comporte un ou plusieurs groupes réactifs lui permettant de se lier à la surface (via les -OH) et un ou plusieurs groupes fonctionnels engendrant la spécificité de la surface ou permettant le couplage avec d'autres molécules. Dans ce dernier cas, le silane est considéré comme un bras espaceur. La réaction entre le groupe réactif et la surface est appelée **silanisation**.

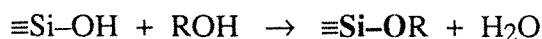
I.121. Schéma réactionnel

Les groupements hydroxyle de la surface ont une chimie proche de celle des alcools. Notamment, ils peuvent donner des liaisons de type [Colin et Guiochon, 1977] :

- *amino* :



- *alkoxy* :



- *carbone* :



- *siloxane* :



I.122. La liaison siloxane

Les deux premières sont facilement hydrolysables et donc instables. La liaison de type carbone est la plus stable. La dernière est la plus utilisée et réalisée avec un silane comportant un ou plusieurs groupes réactifs X (halogène ou alkoxy) et un groupe fonctionnel R (aryl ou alkyl substitué ou non).

Les halosilanes ont une réactivité croissante en fonction de leur degré de substitution : $\text{X}_3\text{SiR} > \text{X}_2\text{SiR}_2 > \text{XSiR}_3$ [Grushka, 1974], mais leur utilisation engendre à forte concentration, la formation d'acides qui peuvent hydrolyser la liaison formée.

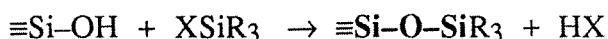
En ce qui concerne les alcoxysilanes, pour lesquels les produits de la réaction sont des alcools, il existe un risque de réaction secondaire entre ceux-ci et les silanols de la surface [Sindorf et Maciel, 1983]. Le pourcentage de recombinaison est de 17 % dans le cas d'un méthyltriéthoxysilane.

Dans la littérature, il apparaît deux types de silanisation possibles :

- une réaction en une étape : le silane se lie directement avec le silanol de la surface (dans un solvant, en conditions anhydres ou non),
- une réaction en deux étapes : adsorption du silane sur la surface (dans un milieu généralement aqueux) et ensuite formation de liaison covalente par condensation thermique ("post-curing") de la partie réactive avec les silanols [Britcher et al., 1993].

a) Un seul groupe réactif X (type XSiR₃)

La réaction est alors :



Dans ce cas, la réaction est équimoléculaire : un silanol réagit avec un silane. Les avantages de ce type de modification sont les suivants :

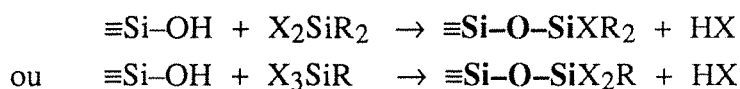
- recouvrement de la surface de type monocouche,
- réaction reproductible.

Une telle couverture présente le désavantage d'être instable, notamment face à l'hydrolyse. En effet, l'accessibilité des liaisons siloxane par des molécules d'eau est

facilitée par la faible épaisseur de la couche. Néanmoins, comparée à un dépôt de type Langmuir-Blodgett, cette monocouche est plus stable en milieu liquide [Duvault et al., 1990].

b) Plusieurs groupes réactifs (type X_2SiR_2 ou X_3SiR)

La réaction s'écrit :



Si la réaction est conduite dans des conditions d'exclusion totale d'eau, la monocouche obtenue est plus stable que celle relative à un seul groupe réactif puisque plus d'une liaison est formée avec les silanols de surface. Dans le cas contraire, la présence d'eau dans le système est un des plus importants paramètres dans la séquence réactionnelle. L'eau engendre une hydrolyse des groupes réactifs X, conduisant à des groupements silanol qui peuvent se combiner pour former une liaison siloxane entre deux molécules de silane, avec production d'une nouvelle molécule. Le polymère formé par combinaisons successives a l'avantage d'être stable face à l'hydrolyse [Kirkland et al., 1989], mais il a le désavantage d'être difficile à maîtriser à moins de contrôler le degré d'humidité.

I.123. Conditions expérimentales

Différentes conditions opératoires ont été utilisées, allant de la modification dans l'eau [Ishida et Koenig, 1980 ; Wang et al., 1992] à celle dans un solvant organique anhydre ou non (toluène [Ogasawara et al., 1992 ; Urbano et al., 1984 ; Wolfbeis et al., 1984], n-hexane [Menawat et al., 1984], isopentane [Duvault et al., 1990], xyène [Kirkland et al., 1989], éthanol [Kumar et al., 1994 ; Lin et al., 1988]) en passant par une réaction à température ambiante [Wang et al., 1992] ou à reflux [Wolfbeis et al., 1984] ou même à températures très basses [Duvault et al., 1990], avec des durées variant de quelques minutes [Ishida et Koenig, 1980] à plusieurs heures [Jönsson et al., 1985_a]. Le choix des conditions expérimentales est guidé par l'utilisation ultérieure de la surface et ses caractéristiques dont certains aspects seront détaillés dans le § I.3.

Le tableau (A1).1 donné en annexe I permet d'avoir un aperçu des multiples possibilités offertes par les combinaisons entre la nature et la géométrie de la surface, le type de groupe réactif et la nature de la fonction portée par le silane, l'utilisation finale de la surface modifiée, etc.

1.13. Couplage avec d'autres molécules

Le silane portant une extrémité fonctionnelle peut réagir avec une molécule organique. Le choix de cette molécule est guidé par l'utilisation ultérieure de la surface (cf. tableau (A1).1).

Weetall (1975) a établi une liste des différents types de couplage permettant de coupler des enzymes libres (par leurs fonctions $-NH_2$) avec des molécules immobilisées sur la surface (partie fonctionnelle : aldéhyde, acide carboxylique, isocyanate, isothiocyanate, etc.).

Ces procédés sont largement utilisés en biochimie pour la mise au point de capteurs immunologiques. Toutefois, plusieurs auteurs font état d'un phénomène d'adsorption physique des molécules sur les surfaces silanisées, concurrençant la liaison covalente [Jönsson et al., 1985_b ; Leckband et Langer, 1991 ; Vandenberg et al., 1991 ; Williams et Blanch, 1994 ; etc.]. Ce point sera discuté dans le § I.4.

I.2. CARACTERISATION DE LA SURFACE ACTIVEE

I.2.1. Analyse qualitative de la surface activée

I.2.1.1. Etude par spectrométrie photoélectronique à rayons X (XPS ou ESCA)

Dans une étude, Duvault et al. (1990) testent différentes activations chimiques des surfaces. La composition, après le traitement, est analysée par XPS. Le tableau (I).1 donne le rapport de l'intensité du pic des électrons 1s du carbone (C_{1s}) et du pic des électrons 2p du silicium (Si_{2p}), obtenu pour chaque type de préparation.

Après une oxydation thermique, la pollution de la surface en carbone n'est rien d'autre que la pollution d'origine. Par contre, un traitement dans des solvants organiques ou une hydratation de la surface par immersion pendant 10 min dans une eau ultra pure (résistivité, 18 M Ω) entraînent une forte contamination au carbone (rapports de 0,669 et 0,232).

Les auteurs observent finalement, que la pollution d'origine en carbone disparaît à la suite d'un traitement sulfochromique (0,044) et que celui-ci ne laisse aucune trace de contamination au chrome sur la surface en silice. Une image au microscope électronique à balayage révèle une surface homogène et une analyse par ellipsométrie indique qu'après un tel traitement, l'épaisseur de la couche superficielle a diminué de 6 Å.

Les auteurs concluent alors, au vu des résultats expérimentaux, que le traitement sulfochromique agit comme un bon nettoyant de la silice tout en préservant sa structure. Par la suite, des mesures de capacitance effectuées sur silice i) après une simple immersion de 3 min dans une solution sulfochromique et ii) après immersion pendant une nuit dans l'eau pure, montrent que le mélange acide n'a pas uniquement une fonction de nettoyant de la surface, mais il semble qu'il favorise l'hydratation.

Tableau (I).1.
Rapports d'intensités obtenues par XPS
après différents traitements de la surface SiO₂ [Duvault et al., 1990].

Traitement	Rapport d'intensité C _{1s} : Si _{2p}
Après oxydation thermique	0,137
Après traitement par des solvants organiques (trichloroéthylène, alcool isopropylique, acétone)	0,669
Après hydratation	0,232
Après traitement sulfochromique	0,044

Dans une autre étude réalisée par Menawat et al. (1984) la composition en éléments atomiques, obtenue par spectrométrie photoélectronique d'électrons Auger, est déterminée avant et après un traitement à la méthyléthylcétone et à l'acide nitrique chaud.

Dans le tableau (I).2, il apparaît clairement que les impuretés présentes sur la surface avant le traitement ont disparu.

Ces résultats sont la preuve d'un bon nettoyage de la surface car seuls les éléments carbone, oxygène et silicium sont détectés sur la surface. Le niveau en carbone est de 0,17 (fraction atomique) même après le traitement, ce qui représente, à nouveau, la pollution d'origine de la surface. Kallury et al. (1994) précisent que la nature et l'étendue de cette contamination au carbone varient avec les conditions d'activation.

Tableau (I).2.
Composition en éléments de la surface en silice avant et après l'activation.
Résultats de spectrométrie d'électrons Auger [Menawat et al., 1984].

Elément	Fraction atomique	
	Avant	Après
C	0,345	0,175
O	0,298	0,439
Si	0,184	0,386
S	0,011	-
Cl	0,070	-
Ca	0,016	-
N	0,012	-
Fe	0,116	-
Ni	0,003	-
Na	0,007	-

I.212. Etude par bombardement atomique rapide (FAB)

La technique de la spectroscopie de masse par bombardement d'atomes rapides ("fast atom bombardment") a permis à Surman et al. (1982) de connaître le nombre de silanols en fonction de l'hydroxylation en enregistrant le rapport des ions $\text{SiO}^+/\text{SiOH}^+$.

En suivant le rapport $\text{SiO}^+/\text{SiOH}^+$, les auteurs ont montré que :

- avant passage sous la vapeur d'eau la valeur du rapport est de 4 à 300 K,
- après exposition à de la vapeur d'eau à 10^{-6} Torr, le rapport atteint la valeur 0,25,
- lorsque la température augmente graduellement, ils observent une lente déshydroxylation.

I.213. Hétérogénéité de la surface

Est-ce que les fonctions -OH sont distribuées régulièrement sur la surface [Rouméliotis et Unger, 1978] ou sont-elles sous forme de "clusters" hétérogènes [Lochmueller et Wilder, 1979] ?

Lochmüeller et Wilder, 1979, ont utilisé le processus de complexation intermoléculaire entre l'état fondamental et l'état excité du pyrène pour apporter une réponse. L'idée est de modifier la surface avec un dérivé du pyrène ([3-(3-pyrényl)propyl]diméthylchlorosilane) à différentes concentrations. Si un pic de fluorescence dû à l'existence d'excimères apparaît, alors en absence de diffusion, cela doit correspondre à des régions de haute densité en pyrène. Les auteurs ont trouvé que, bien que la distance intermoléculaire nécessaire pour la complexation soit inférieure à 5 Å, une émission significative avait lieu pour une distance moyenne de 12 Å. Ils ont conclu que la phase greffée était représentée par des "clusters" de ligands, donc que les silanols étaient aussi présents sous la même forme. Cependant, ils ont émis l'hypothèse que la surface était plane et que la formation d'excimères dans les pores du gel de silice pouvait être supposée négligeable puisque le diamètre moyen des pores est 4 fois plus grand que la distance maximale entre les sites de liaison.

Or, d'un point de vue chimique, il est difficile de visualiser ce qui pourrait être une source de regroupement des silanols pendant la synthèse par polymérisation des gels de silice et il n'y a aucune raison pour ne pas accepter l'idée d'une distribution homogène de silanols (géminaux, vicinaux ou isolés) comme le décrivent Rouméliotis et Unger. Mais cet argument n'est valable que dans le cas d'une surface plane.

Avnir (1987) donne une solution à ce dilemme, en annonçant que, sur une surface irrégulière, les images données par Rouméliotis et Lochmüeller coïncident : en effet, la distribution homogène et celle sous forme de "clusters" décrivent la situation des silanols de surface dans la mesure où la surface est considérée en réalité comme une succession de zones concaves et convexes. Dans les zones concaves, il y a une haute densité en sites réactifs et dans les zones convexes, une plus petite (figure (I).4).

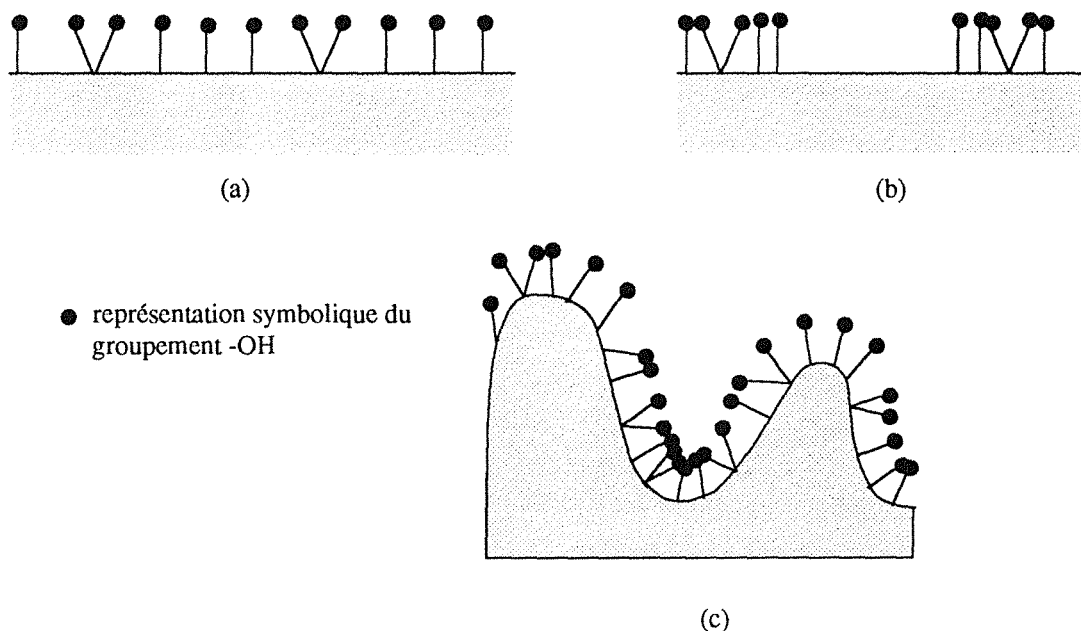


Figure (I).4.
Configurations des sites réactifs d'après Avnir (1987) :
(a) image homogène,
(b) image hétérogène (sous forme de "clusters"),
(c) suggestion de l'auteur : distribution homogène, qui
du fait de la concavité ou de la convexité, engendre ou non des "clusters".

1.22. Analyse quantitative de la surface activée

Le nombre de silanols initialement sur la surface dépend du mode de fabrication de la silice. Mais après activation, ce nombre semble être identique et égal à 5 silanols par nanomètre carré (espacés de 5 Å), soit $8 \mu\text{mol.m}^{-2}$ [Kallury et al., 1994 ; Kirkland et al., 1989 ; Vivilecchia et al., 1974].

Pétiaud, 1994, détermine un nombre de silanols non liés d'environ $6,5 \mu\text{mol.m}^{-2}$ avant tout traitement de la silice, ce qui correspondrait donc à une augmentation des sites réactifs de 23 % lors de l'activation.

I.3. CARACTERISATION DE LA SURFACE SILANISEE

I.31. Analyse qualitative de la surface silanisée

I.311. Influence de l'eau

Nous avons vu au § I.122.b que l'eau était un facteur important dans l'étape de silanisation, lorsque celle-ci avait lieu avec un silane ayant au moins deux extrémités réactives. Le réseau polysiloxane engendré peut être ou non un inconvénient suivant l'utilisation ultérieure de la surface.

a) Silanisation dans un solvant

Lorsque la teneur en eau dans le milieu réactionnel n'est pas contrôlée, les chaînes polysiloxane se développent aléatoirement. Cependant, il est possible de distinguer deux types de polymérisation, suivant la localisation géographique des molécules d'eau.

La polymérisation verticale (schémas d, e et e' de la figure (I).6) a lieu dans le cas où l'eau est uniquement confinée dans le milieu réactionnel. Ainsi, les chaînes polysiloxane se développent en dehors de la surface [Goodwin et al., 1990 ; Sindorf et Maciel, 1983].

La polymérisation horizontale (schémas h, i et i' de la figure (I).6) est obtenue par réhydratation de la surface, avant une silanisation dans un milieu réactionnel anhydre, soit par de l'eau liquide [Le Grange et al., 1993], soit par de l'eau vapeur [Wirth et Fatunmbi, 1992 et 1993]. Ainsi, le développement du polymère a lieu uniquement sur la surface et engendre une monocouche. Le Grange et al. (1993) dans l'étude faite sur l'influence de la réhydratation par l'eau liquide d'une surface en silice avant silanisation, montrent que les molécules de silane (octadécyltrichlorosilane, OTS) forment, après réaction, une structure dense et ordonnée. De plus, environ une molécule d'OTS sur cinq s'est réellement liée avec les silanols de la surface, les autres extrémités réactives ayant réagi entre elles, formant ainsi une monocouche de polymère.

Vrancken et al. (1992) ont réalisé une série de silanisations par du 3-aminopropyltriéthoxysilane (APTES) sur du gel de silice déshydraté en utilisant différentes quantités d'eau dans le milieu réactionnel.

La formation du polymère est évaluée par spectroscopie IR à transformée de Fourier en intégrant la bande due à la liaison Si-O-Si. Les valeurs montrent une augmentation nette liée à celle de la teneur en eau du solvant. Il est alors clair que la quantité d'eau est le facteur déterminant dans le processus de polymérisation.

De plus, en comparant les pics Si-O-Si d'un échantillon silanisé en milieu aqueux à partir de gel de silice déshydraté et d'un échantillon silanisé dans le toluène à partir de gel de silice hydraté, les auteurs observent une augmentation de la quantité de silane polymérisé sur la surface en silice dans le dernier cas. Ainsi, la polymérisation aurait lieu sur la surface en silice après une adsorption des molécules de silane. Cet effet de surface pourrait être expliqué par l'interaction des groupes -NH₂ avec la surface. Dans l'eau, les molécules aminosilane hydrolysées peuvent être stabilisées par liaison hydrogène interne des groupes amino aux hydroxyles du silane (figure (I).5). Lorsqu'un tel groupe amino est lié par liaison hydrogène aux silanols de surface, cette stabilisation disparaît et il y a alors possibilité de condensation des hydroxyles pour former des liaisons siloxane.

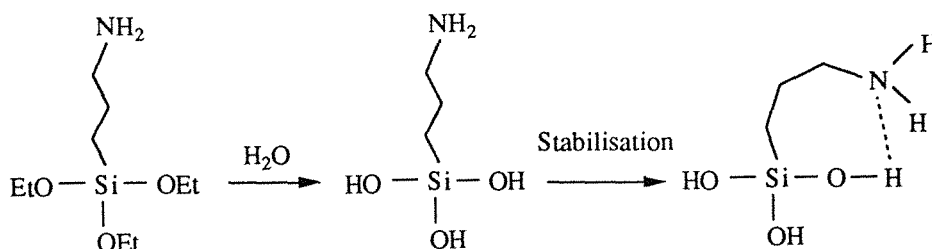


Figure (I).5.
Stabilisation des molécules d'APTES par liaison hydrogène dans le cas d'une silanisation en milieu aqueux.

Lorsque la réaction a lieu avec une surface hydratée dans un solvant anhydre, l'hydrolyse a lieu uniquement sur la surface et peut immédiatement être suivie par une condensation.

b) Silanisation en milieu aqueux

La silanisation en milieu aqueux, très prisée dans l'industrie, n'offre pas de dualité quant à la formation d'une ou plusieurs couches mais permet, de par la structure polymère du dépôt, de réaliser des interfaces très stables pour les matériaux composites.

Fonctions réactives restantes après une première liaison

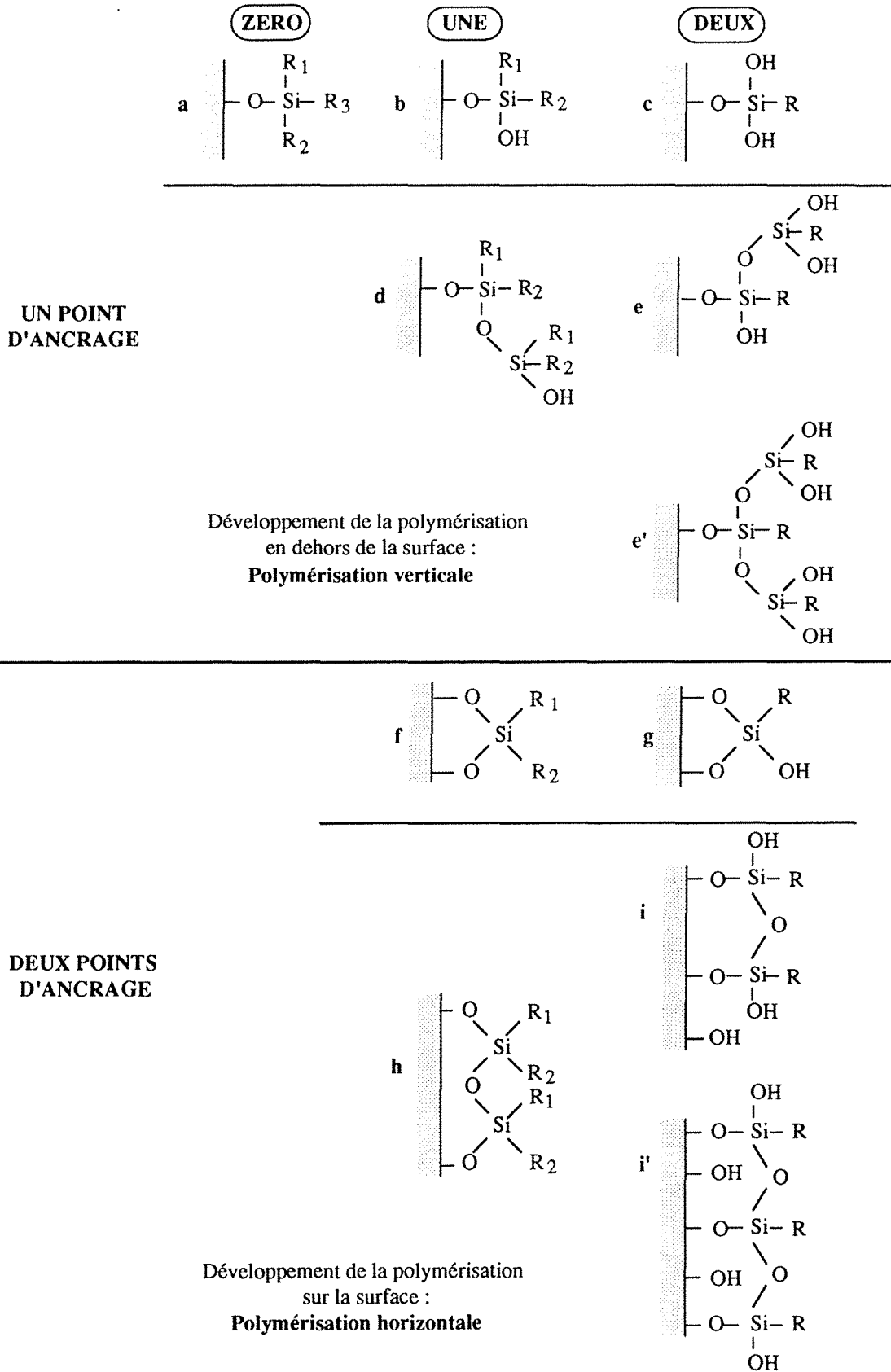


Figure (I).6. Etat de la surface après une silanisation en présence d'eau.

c) Méthodes d'analyse

Les méthodes d'analyse permettant d'étudier l'influence de l'eau sur la silanisation sont surtout liées à :

- l'épaisseur de la couche qui varie suivant la teneur en eau (monocouche ou multicouche),
- la proportion de molécules de silane par rapport aux atomes Si de la silice (déterminée par une analyse élémentaire de la surface).

Ainsi, deux types existent fondés d'une part sur la mesure de l'épaisseur (mesure d'angles de contact et ellipsométrie) et d'autre part, sur la détermination des éléments de la surface (ESCA, FT-IR, ISS, SIMS, etc.).

Le tableau (I).3 donne un aperçu non exhaustif des méthodes citées dans la littérature.

Tableau (I).3.
Méthodes d'analyse de l'influence de l'eau sur la qualité de la surface silanisée
(décrites dans la littérature).

Méthode d'analyse	Etudes	Auteurs
ESCA	Mise en évidence de la formation de polymère	Moses et al., 1978
FT-IR et Ellipsométrie	Influence de l'hydratation et de la déshydratation de la surface sur le dépôt d'OTS sur silice	Le Grange et al., 1993
FT-IR et CP MAS NMR	Influence de l'eau dans la silanisation de gel de silice par l'APTES	Vrancken et al., 1992
ISS et SIMS	Etude de l'interface APTES/surface (polysiloxane)	Di Benedetto et Scola, 1978
Mesure d'angles de contact	Evaluation semi-quantitative du film silane	Bhatia et al., 1989
CP MAS NMR	Etude de la structure du dépôt de méthyl-di- et trichlorosilane	Sindorf et Maciel, 1983
FAB	Analyse de la monocouche externe d'un dépôt d'OTS	Simko et al., 1985

I.312. Géométrie du dépôt silane

a) Silanisation dans un solvant

La géométrie du dépôt silane réalisé dans un solvant dépend en partie de la teneur en eau du milieu réactionnel comme nous l'avons décrit au § I.311.a.

b) Silanisation en milieu aqueux

La technique ISS-SIMS est idéale pour déterminer la géométrie de la surface silanisée. Di Benedetto et Scola (1978) ont montré qu'après une silanisation en milieu aqueux le dépôt est constitué de trois parties : la partie la plus externe (jusqu'à 140 Å de profondeur) est constituée d'une couche polymère très stable, avec une masse moléculaire élevée. La région comprise entre 160 et 240 Å, est constituée d'une couche d'oligomère silane et finalement à partir de 240 Å et jusqu'à la surface silice, il y a à nouveau, un polymère à masse moléculaire élevée.

Ceci est confirmé par Wang et al. (1992) dans une étude relative à la silanisation de surface en verre (matériau utilisé pour la fabrication de fibres de verre) par de l'APTES en milieu aqueux (pH = 10,6). Ils constatent l'existence d'un dépôt formé de trois domaines. Proche de la surface en verre se trouvent quelques couches de poly(3-aminopropyl)siloxane fortement chimisorbées, au-dessus desquelles il y a une couche de structure moléculaire tridimensionnelle faiblement chimisorbée et enfin une couche essentiellement formée d'oligomères qui peut être enlevée par immersion dans l'eau chaude.

c) Méthodes d'analyse

Les méthodes d'analyse permettant d'étudier la géométrie du dépôt sont liées à :

- la détermination de l'épaisseur (techniques d'ellipsométrie et de mesure d'angles de contact),
- la caractérisation des structures présentes (SIMS, ISS, FT-IR, etc.).

Le tableau (I).4 établit une liste non exhaustive des méthodes décrites dans la littérature.

Tableau (I).4.
Méthodes de détermination de la géométrie du dépôt silane
(décrites dans la littérature).

Méthode d'analyse	Résultats	Auteurs
ISS et SIMS	Structure élémentaire et géométrie du dépôt d'APTES <i>Epaisseur : ≤ 80 Å</i>	Di Benedetto et Scola, 1978
Ellipsométrie	Mesure de l'épaisseur du greffage d'OTS <i>Epaisseur : 28 ± 2 Å</i>	Le Grange et al., 1993
TOF-SIMS	Structure élémentaire et géométrie du dépôt d'APTES <i>Epaisseur : > 2 à 3 monocouches</i>	Wang et al., 1992
FT-IR	Structure géométrique du dépôt d'APTES <i>Epaisseur : monocouche</i>	Chiang et al., 1980
Technique de résonance paramagnétique électronique	Structure géométrique de dépôts d'octadécylméthylchlorosilane à différentes densités	Wright et al., 1992
Mesure d'angles de contact	Structure géométrique	Menawat et al., 1984

I.313. Stabilité de la surface silanisée

a) Origines de l'instabilité

Il y a trois processus qui peuvent affecter la stabilité des surfaces :

- l'hydrolyse de la liaison surface-silane,
- la désorption de molécules faiblement liées,
- la recombinaison de molécules secondaires.

a1) L'hydrolyse

Elle peut avoir lieu en présence d'humidité, dans l'eau et éventuellement dans l'air. L'hydrolyse est facilitée par la pénétration des molécules d'eau à travers la couche silane. Il apparaît donc clairement que des surfaces ayant une couverture polymère seront moins sensibles à ce phénomène à cause de l'inaccessibilité des sites. De même, des substituants volumineux sur le silane auront cette action : c'est le cas décrit dans l'étude de Menawat et al. (1984) qui observent une différence entre une surface méthylée et une surface recouverte de groupements phényle.

a2) La désorption de molécules silane faiblement liées

Le phénomène de désorption est lié à la nature du solvant dans lequel la surface est immergée. En effet, certains silanes, suivant les groupements qu'ils contiennent, seront plus ou moins désorbés. Par exemple, Menawat et al. (1984) observent une plus forte désorption dans le xylène que dans l'eau pour les mêmes surfaces silanisées.

Le phénomène de gêne stérique joue aussi un rôle, puisque les molécules doivent être accessibles.

Cette désorption a été observée par Haller (1978), avec l'APTES. Après traitement des surfaces à reflux dans des solvants secs et polaires (tétrahydrofurane, chloroforme, ou acétonitrile), une dégradation des groupes aminopropyle peut être mise en évidence par mesure des points isoélectriques.

a3) La recombinaison des molécules secondaires

Dans le cas de silanisation avec des éthoxysilanes, Sindorf et Maciel (1983), ont montré l'existence de réactions secondaires mettant en jeu la liaison entre des produits de la silanisation (éthanol) et des groupes présents sur la surface de la silice (fonctions Si-O-H obtenues suite à l'hydrolyse des Si-O-Et des éthoxysilanes). Cette réaction "parasite" va créer une surface dont les propriétés ne seront plus uniquement liées aux silanes. Ainsi, la présence de ces impuretés est un facteur de déséquilibre.

Bien entendu, une combinaison des trois processus est possible.

b) Remèdes

Il semble, *a priori*, qu'un dépôt polymère soit avantageux pour augmenter la stabilité. En effet, l'accessibilité des sites hydrolysables ou sujets à la désorption est réduite par le réseau polysiloxane. De plus, la phase polymère semble être un moyen efficace pour masquer les sites silanol et empêcher une éventuelle recombinaison. Cependant, nous avons vu que ce type de couverture de surface n'est pas reproductible.

Une solution pour augmenter la stabilité est de lier le silane à la surface par plus d'une liaison covalente. Kirkland et al. (1989), ont montré que pour obtenir des surfaces stables utilisables en CLHP, il était nécessaire de faire réagir des réactifs silane "bidentés" (deux fonctions réactives). Avec cette approche, en sélectionnant la distance convenable entre les groupes réactifs, il est possible de réaliser la meilleure liaison entre ces groupes et les silanols de la surface. Ainsi, d'une part, les silanes bidentés réagissent avec une plus grande population de groupes Si-OH sur la surface en silice et d'autre part, les silanes bidentés peuvent former deux liaisons pour chaque molécule de silane. Ces deux liaisons produisent une structure en anneau avec la structure de la silice qui conduit à une augmentation de la stabilité.

Une deuxième solution est une polymérisation du silane uniquement sur la surface (cf. § I.311.a). Ainsi, les liaisons multiples à la surface et la présence d'une telle couverture, retardent le phénomène d'hydrolyse de la liaison siloxane. C'est ce qu'ont montré Wirth et Fatunmbi (1992 et 1993).

c) Méthodes d'analyse

Les méthodes d'analyse de la stabilité de la surface sont en général réalisées sur des durées variables et l'analyse doit être reproductible. Le tableau (I).5 donne un aperçu des possibilités offertes et décrites dans la littérature.

Tableau (I).5.
Méthodes d'analyse de la stabilité de la surface silanisée.

Méthode d'analyse	Etudes	Quelques auteurs
Mesure des points isoélectriques sur des surfaces modifiées par des fonctions amino	Etude de la stabilité du dépôt face à l'hydrolyse et à différents pH	Goodwin et al., 1990
Résonance magnétique nucléaire du solide	Détermination du taux de recombinaison de l'éthanol	Sindorf et Maciel, 1983
Mesure des taux de rétention de colonne chromatographique	Etude de la dégradation de la couverture silane	Kirkland et al., 1989
Mesure d'angles de contact	Etude de la dégradation du dépôt après des séjours dans l'eau et l'air	Wei et al., 1993

I.314. Influence du catalyseur

a) Le chlorure de *para*-toluènesulfonyle

Urbano et al., 1984, ainsi que Kawabata et al. (1987) utilisent le chlorure de *para*-toluènesulfonyle comme catalyseur de la réaction de silanisation de l'APTES dans du toluène. Il active les sites silanol de la surface en introduisant une fonction chlore plus réactive vis-à-vis des groupes éthoxy de l'APTES (figure (I.7)).

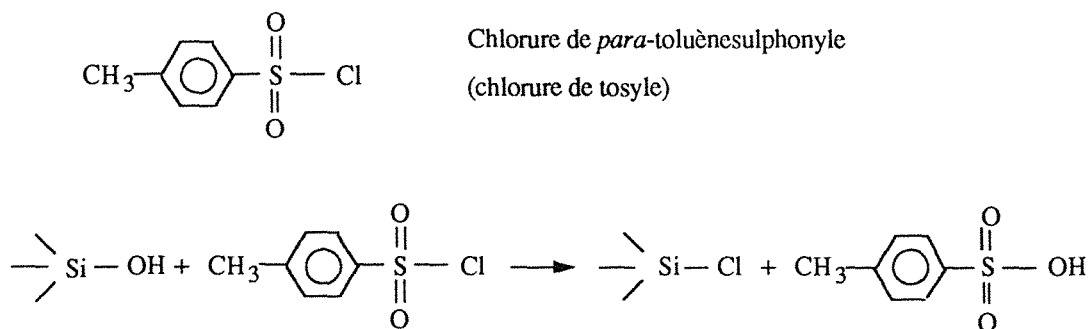


Figure (I.7).
Schéma réactionnel de la catalyse par le chlorure de *para*-toluènesulfonyle de la réaction de silanisation.

b) Les amines

Blitz et al. (1988), ont étudié l'influence de différentes amines (éthylamine, diéthylamine, triéthylamine et pyridine) sur la réaction de silanisation de gel de silice par du triméthoxyméthylsilane dans du toluène. Les mêmes auteurs, dans un précédent rapport [Blitz et al., 1987], avaient montré que l'ammoniaque catalysait la réaction de condensation directe de méthoxyméthylsilanes non hydrolysés avec du gel de silice en l'absence d'eau adsorbée à la surface. Les résultats décrits (tableau (I.6)) montrent que l'éthylamine, la diéthylamine et l'ammoniaque sont des catalyseurs plus efficaces que la triéthylamine et la pyridine.

Tableau (I.6).
Rapport des surfaces des pics SiCH₃/Si-O-Si
pour une quantité de 0,4 mmol de catalyseur.
[Blitz et al., 1988_b]

Catalyseur	Silanisation du triméthoxyméthylsilane sur :	
	Gel de silice "humide"	Gel de silice "sec"
Ethylamine	3,75 ± 0,06	2,43 ± 0,06
Diéthylamine	3,37 ± 0,20	2,36 ± 0,21
Triéthylamine	1,18 ± 0,09	1,16 ± 0,05
Ammoniaque	2,91 ± 0,08	1,60 ± 0,08
Pyridine	0,88 ± 0,17	0,41 ± 0,08
Aucun	0,30 ± 0,01	

Le premier schéma réactionnel envisagé passe par un intermédiaire silane pentacoordiné et commence par l'adsorption de l'amine sur les Si-OH de la surface par une liaison hydrogène (figure (I).8). Les résultats expérimentaux suggèrent que les amines avec des hydrogène labiles (ammoniaque, éthylamine et diéthylamine) sont de meilleurs catalyseurs que ceux sans hydrogène labile (triéthylamine et pyridine). Dans ce dernier cas, la triéthylamine montre une activité catalytique plus forte que la pyridine.

Si le catalyseur possède un hydrogène labile, l'amine a alors deux fonctions :

- (i) l'adsorption sur un site silanol de surface qui augmente le caractère nucléophile de ce site,
- (ii) l'aide au départ du groupe méthoxy par don d'un proton (ce phénomène connu sous le nom d' "assistance électrophile").

Si le catalyseur ne possède pas d'hydrogène labile, il ne peut y avoir d' "assistance électrophile". Ainsi, le groupe méthoxy doit alors prendre un proton sur le silanol dans le cas de silice déshydratée.

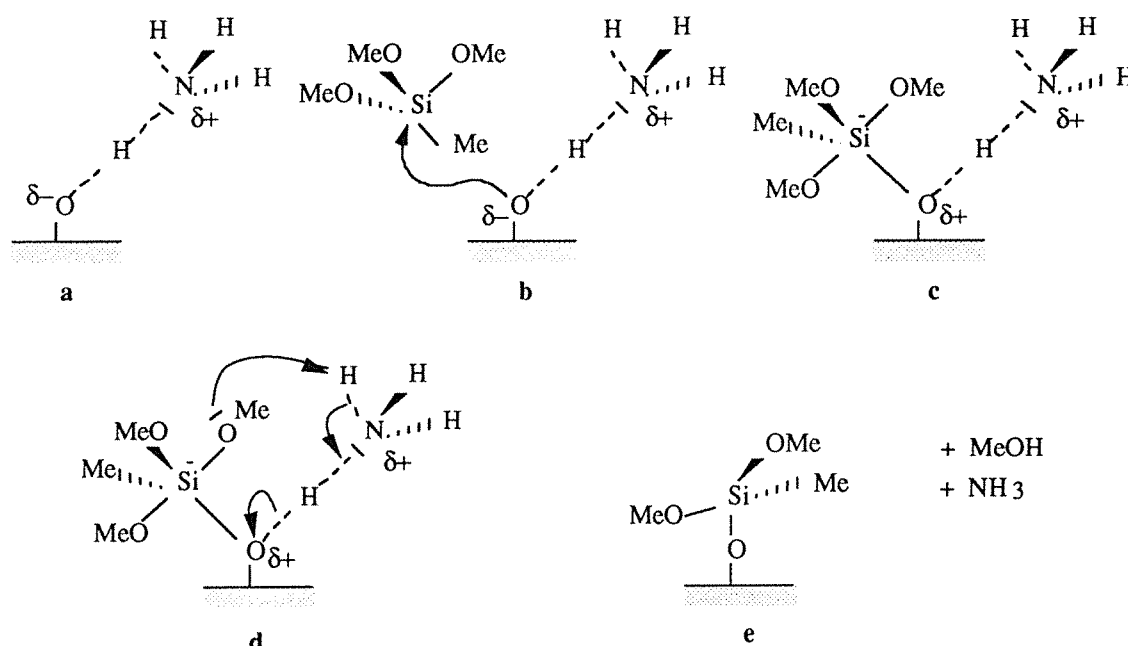


Figure (I).8.

Description du mécanisme général de la catalyse par l'ammoniaque de la réaction de silanisation du méthyltriméthoxysilane

- a- adsorption de l'ammoniaque sur le site silanol
- b- attaque nucléophile de SiO(δ^-) sur la silice,
- c- intermédiaire pentacoordiné,
- d- arrachement d'un proton par le groupe méthoxy partant avec assistance électrophile de l'ammoniaque,
- e- surface silanisée et produits de la réaction.

Un deuxième schéma réactionnel envisagé, qui ne peut se produire qu'en milieu hétérogène, décrit la formation d'une liaison (Si-O-Si) et la cassure d'une autre (Si-O-Me) de façon simultanée (figure (I).9). Dans ce cas, une amine ne possédant pas d'hydrogène labile n'est pas capable de catalyser la réaction de silanisation par ce mécanisme.

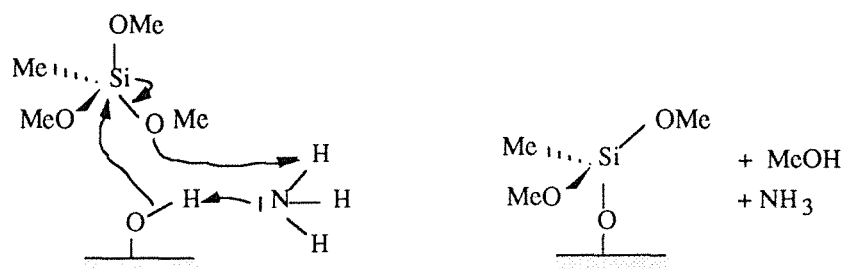


Figure (I).9.
 Mécanisme général de la catalyse par l'ammoniac de la réaction de silanisation du méthyltriéthoxysilane avec rupture et formation simultanée d'une liaison.

De plus, nous pouvons remarquer que la présence d'eau sur la surface du gel de silice augmente le taux de silanisation.

Kallury et al. (1994) ont étudié l'influence de la triéthylamine dans l'étape de silanisation, par une étude par spectroscopie photoélectronique à rayons X. Les résultats ont montré que le groupe amino de l'APTES participe aux interactions de surface de façon prédominante lorsqu'il n'y a pas de catalyseur. En particulier, il peut servir de nucléophile pour lui-même en aidant le départ du proton du silanol (figure (I).10).

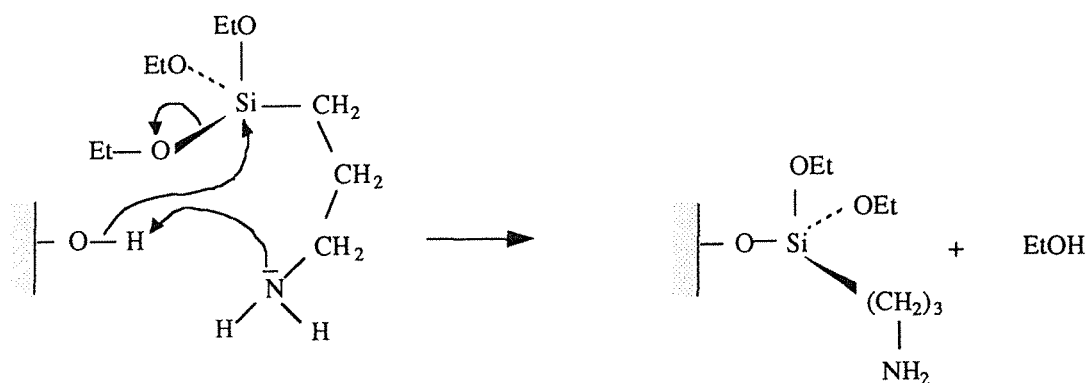


Figure (I).10.
 Interaction de l'APTES avec la surface en absence de triéthylamine.

Lorsque la triéthylamine est utilisée, ces interactions sont réduites de 30 % par compétition avec la fonction amino de cette molécule. Ainsi, cette base promeut clairement la formation de la liaison siloxane de surface entre l'APTES et le silanol.

I.32. Analyse quantitative de la surface silanisée

I.321. Détermination de la concentration surfacique des silanes

Théoriquement, si chaque silanol réagissait avec une molécule de silane, le taux de silanisation serait de $8 \mu\text{mol.m}^{-2}$ (cf. § I.22). Cette valeur théorique ne tient pas compte de la géométrie du silane, de sa possibilité de polymériser et suppose une réactivité des sites silanol vis-à-vis des silanes de 100 %. Une étude réalisée par Pétiaud (1994) montre que la réaction n'est efficace qu'à 50 % quel que soit le silane lié, confirmant ainsi le rapport de Colin et Guiochon (1977). Donc, la concentration maximale en silane à la surface est de l'ordre de $4 \mu\text{mol.m}^{-2}$.

Ce raisonnement est valable si le silane n'a qu'un seul groupe réactif X. Dans le cas où le silane a deux ou trois fonctions réactives, il ne peut se lier qu'avec deux extrémités. Le cas de trois liaisons avec la surface est improbable car le cycle à 4 atomes qui pourrait être formé est trop tendu. Ainsi, pour un silane avec deux ou trois extrémités réactives, la concentration est comprise **entre $2 \mu\text{mol.m}^{-2}$** (cas où le silane a deux points d'ancrage sur la surface) **et $4 \mu\text{mol.m}^{-2}$** (cas où le silane n'a qu'un point d'ancrage).

I.322. Les valeurs de la littérature et leurs méthodes de détermination

Le tableau (I).7 donne un aperçu des méthodes de détermination de la densité de silanisation.

Tableau (I).7.
Méthodes de détermination et valeurs des densités de greffage.

Silane	Méthode	Densité ($\mu\text{mol.m}^{-2}$)	Auteurs
ODDAS	Hydrolyse acide (HF) de la liaison siloxane et analyse par CPG du fluorosilane obtenu	$4,8 \pm 0,2$	Duvault et al., 1990
	Calcul par l'équation de Kovats (fonction de l'aire spécifique, du nombre d'atomes de C sur l'unité silyle, du poids moléculaire, etc.)	$4,18 \pm 0,03$	Szabó et al., 1984
OTS	Spectroscopie IR	$60 \pm 10 \text{ \AA}^2$	Burbage et Wirth, 1992
MPS	Analyse par FT-IR de la bande C=O autour de $1740-1720 \text{ cm}^{-1}$ après désorption dans l'eau bouillante	28	Ishida et Koenig, 1980
	Spectroscopie FT-IR et CP MAS-NMR sur différentes silices	1,4 à 4,2	Carlier et al., 1991
APTES	Mesure du pourcentage en carbone oxydé par l'oxygène en CO_2	4,1-4,5	Leyden et al., 1978
	Mesure de la capacité de complexation avec les ions Cu^{2+} en solution	2,3-3,6	Leyden et al., 1978
	Calcul par l'équation de Kovats (fonction de l'aire spécifique, du nombre d'atomes de C sur l'unité silyle, du poids moléculaire, etc.)	9,4 à 21,5	Kallury et al., 1994
	Spectroscopie FT-IR et CP MAS-NMR sur différentes silices	1,9 à 4,4	Carlier et al., 1991
AAprop	Mesure de la capacité de complexation avec les ions Cu^{2+} en solution	1,8-5,4	Leyden et al., 1978
	Mesure du pourcentage en carbone oxydé par l'oxygène en CO_2	2,1-6,2	Leyden et al., 1978
TMS	Mesure du pourcentage en élément carbone par CP-MAS RMN	4,0-4,7	Kirkland et al., 1989

I.323. Détermination de l'épaisseur du dépôt silane

Dans le cas strict d'une monocouche, Riedo et al., 1978, ont déterminé par calcul l'épaisseur du dépôt silane, en fonction de la longueur de la chaîne hydrocarbonée pour un diméthylalkylsilane (figure (I.11)).

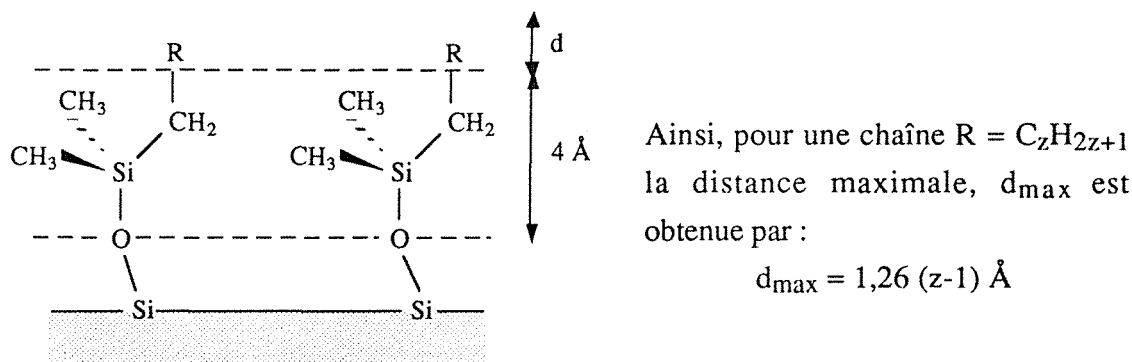


Figure (I.11).
Epaisseur de la monocouche silane pour un diméthylalkylsilane.

Ainsi, grâce à cette formule, il est possible de calculer l'épaisseur théorique d'une monocouche de silane. Par exemple, dans le cas du 3-aminopropyltriéthoxysilane ($R = C_2H_4$), en supposant que les groupes éthoxy n'influencent pas de façon notable le calcul :

$$d_{\max} = 1,26 \times (2-1) = 1,26 \text{ \AA}$$

soit une épaisseur calculée : $e = 1,26 + 4 = 5,26 \text{ \AA}$.

A ceci, il faut ajouter l'épaisseur due à la présence de la fonction NH_2 , soit $2,03 \text{ \AA}$ (calculée en prenant les valeurs suivantes : $d_{C-N} = 1,469 \text{ \AA}$, $d_{N-H} = 1,009 \text{ \AA}$, $\alpha_{C-C-N} = 112^\circ$, et $\alpha_{C-N-H} = 107^\circ$ [Handbook of Chemistry and Physics, 72nd edition, 1991-1992]). Finalement, l'épaisseur calculée pour une monocouche d'APTES serait de :

$$5,26 + 2,03 = 7,29 \text{ \AA} \text{ au maximum}$$

L'étude du greffage avec l'APTES par mesure de capacitance a permis à Bataillard et al. (1988), de déterminer une valeur de 25 \AA , ce qui représenterait 4 couches. Ici, les auteurs ne travaillent pas en conditions anhydres et donc favorisent la formation de polymères.

Dans une étude concernant la stabilité de protéines immobilisées sur des surfaces, Jönsson et al. (1985_c) ont mesuré, par ellipsométrie, l'épaisseur de la couche à la suite d'un dépôt vapeur de N-(2-aminoéthyl-3-aminopropyl)triméthoxysilane (AAprop). Le résultat donne une épaisseur $d = 6 \pm 1 \text{ \AA}$. Le calcul par la méthode de Riedo donne une valeur beaucoup plus forte mais il est difficile de conclure car les molécules ne sont pas obligatoirement perpendiculaires à la surface.

I.4. CARACTERISATION DE LA SURFACE FONCTIONNALISEE

I.41. Analyse qualitative de la surface fonctionnalisée

I.411. Phénomène d'adsorption

Avec le développement des immunodosages, des capteurs en nombre croissant ont vu le jour. Le problème majeur rencontré est la réalisation d'une liaison stable entre des molécules hautement spécifiques que sont les protéines et la surface constituant le support.

Ogasawara et al. (1992) ont remarqué une perte de fluorescence de 10 % de la 3-octylriboflavine dans une solution tampon pendant 5 min d'immersion due au détachement de la protéine (modification de l'intensité quand elle se détache).

Leckband et Langer (1991) ont répertorié et quantifié quatre mécanismes de détachement des molécules :

- dégradation du support,
- dégradation de la protéine,
- désorption de protéines non fixées de façon covalente,
- solvolysse de la liaison.

I.412. Identification des sources principales d'adsorption et techniques pour y remédier

L'adsorption est essentiellement due à des interactions ioniques et hydrophobes et est dépendante des paramètres expérimentaux comme le pH, la force ionique et la quantité de molécules [Kennedy et Cabral, 1983].

Williams et Blanch (1994) ont identifié une des principales sources d'adsorption. Ils ont comparé la quantité de protéines présentes sur trois types de surfaces modifiées différemment (activée, silanisée et fonctionnalisée) représentant les trois étapes de la

procédure de fixation. Les résultats montrent que les protéines sont fixées sur la surface silanisée.

Ces mêmes auteurs ont cherché à réduire ce phénomène d'adsorption en lavant la surface après greffage, avec des agents chaotropiques (engendrant une variation du pH et de la force ionique) mais ces agents affectaient plus les liaisons covalentes que les molécules adsorbées. Williams et Blanch ont alors utilisé un détergent, le Tween 20, qui semblait désorber les molécules. Finalement, le moyen le plus efficace de réduire l'adsorption est de l'éviter en réalisant l'immobilisation en présence de détergents (en milieu aqueux).

Vandenberg et al. (1991) ont réalisé une étude permettant, par silanisation avec de l'APTES et immobilisation des protéines par le glutaraldéhyde, d'identifier les liaisons covalentes et les phénomènes d'adhésion physique. En réalisant un gradient de silane par dépôts successifs de dichlorodiméthylsilane et d'APTES, les auteurs ont montré que :

- le détergent non-ionique, Tween 80, prévient les actions hydrophobes entre la protéine et les surfaces,
- un post-traitement au dodécylsulfate de sodium peut faire la distinction entre liaisons faibles et fortes.

I.42. Analyse quantitative de la surface fonctionnalisée

I.421. Détermination de la concentration de surface en molécules fonctionnelles

La concentration de surface en molécules fonctionnelles greffées dépend du nombre de fonctions réactives présentes sur la surface silanisée. Ainsi, si la réaction de couplage atteint un taux de 100 %, la densité de greffage sera identique à la densité de silanisation. Par ailleurs, le facteur stérique peut intervenir dans le cas de molécules encombrantes (comme pour les protéines).

a) Calcul de la concentration théorique

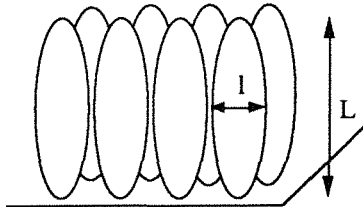
L'encombrement stérique de la molécule fonctionnelle peut être un facteur qui va influencer la réaction. En considérant la molécule de forme ellipsoïdale, nous pouvons établir deux modèles. Le premier étant un modèle simplifié où les molécules sont rangées en ligne et le deuxième plus élaboré, prend en considération la notion d'optimisation de l'espace libre.

a1) Modèle simplifié

Deux cas peuvent être envisagés, dépendant de l'orientation que peut prendre la molécule sur la surface (axe long perpendiculaire ou parallèle à la surface - cf. figure (I).12).

1er cas :

Les molécules sont alignées avec l'axe long perpendiculaire à la surface :

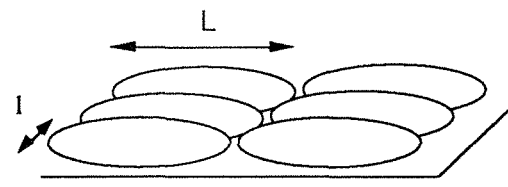


Dans ce cas, 1 cm² peut contenir $\frac{1}{l^2}$ molécules, ce qui représente une concentration théorique :

$$C_1 = \frac{1}{l^2 \times \mathcal{N}} \text{ mol/m}^2$$

2ème cas :

Les molécules sont alignées avec l'axe long parallèle à la surface :



Dans ce cas, 1 cm² peut contenir $\frac{1}{(L \times l)}$ molécules, ce qui représente une concentration théorique :

$$C_2 = \frac{1}{(L \times l) \times \mathcal{N}} \text{ mol/m}^2$$

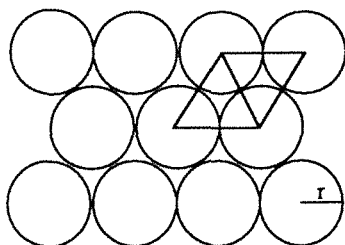
Figure (I).12.

Détermination de la concentration théorique - cas simple
(axe long de la molécule perpendiculaire ou parallèle à la surface)
 \mathcal{N} : nombre d'Avogadro.

a2) Modèle plus élaboré

Le modèle précédent omet une notion importante, qui est celle de l'arrangement maximum (espace libre minimisé).

Esser, 1988, présente une méthode de calcul de la concentration pour l'adsorption de protéines sur du polystyrène, en considérant les molécules disposées en un arrangement monocouche le plus dense possible (figure (I).13).



Si r est le rayon de chaque sphère, la surface du losange sera $2r^2 \times \sqrt{3} = \frac{(2r)^2 \times \sqrt{3}}{2}$

Une molécule occupe donc un espace égal à $\frac{(2r)^2 \times \sqrt{3}}{2}$

Figure (I).13.

Arrangement le plus dense possible selon une monocouche.

Ainsi, la concentration théorique sur la surface sera :

$$C = \frac{2}{\sqrt{3}} \times \frac{1}{N} \times \frac{1}{(2r)^2} \text{ mol/m}^2$$

Dans le cas de molécules globulaires, il faut remplacer la valeur r par les dimensions des axes longs et courts, ainsi, deux concentrations peuvent être obtenues correspondant aux deux cas cités ci-dessus :

1er cas :

Les molécules sont alignées avec l'axe long perpendiculaire à la surface : $2r = l$

$$C_1 = \frac{2}{\sqrt{3}} \times \frac{1}{N} \times \frac{1}{l^2} \text{ mol/m}^2$$

2ème cas :

Les molécules sont alignées avec l'axe long parallèle à la surface : $(2r)^2 = L \times l$

$$C_2 = \frac{2}{\sqrt{3}} \times \frac{1}{N} \times \frac{1}{L \times l} \text{ mol/m}^2$$

b) Méthodes de détermination expérimentale

Les méthodes de détermination de la concentration de surface expérimentale sont souvent liées à la réactivité de la molécule fonctionnelle greffée. En effet, dans le cas de capteurs enzymatiques la réaction de couplage anticorps-antigène va permettre de déterminer le nombre de molécules fonctionnelles présentes, soit par radio-analyse, soit par fluorescence, une des deux molécules entrant en jeu étant alors "marquée". Le tableau (I).8 indique quelques méthodes de détermination de la densité de greffage rencontrées dans la littérature.

Tableau (I).8.
Quelques concentrations de surface citées dans la littérature et leurs méthodes de détermination.

Molécule fonctionnelle	Méthode de détermination	Concentration de surface ($\mu\text{mol/m}^2$)	Auteurs
Anticorps	Radio-analyse	8	Lin et al., 1988
"	"	1	Kumar et al., 1994
"	Immunofluorimétrie	1	Sutherland et al., 1984
"	"	0,1-1,25 (g/m^2)	Bright et al., 1990
"	"	0,01 (g/m^2)	Petrea et al., 1988
Indicateur coloré	Fluorimétrie (étalonnage par rapport à l'indicateur en solution)	0,25	Urbano et al., 1984
"	Colorimétrie	1,4 - 3,3	Mimms et al., 1977
"	"	1,12	Untereker et al., 1977
"	Dégreffage puis analyse par colorimétrie	0,12 - 0,33	Offenbacher et al., 1986

I.422. Cinétique de la désorption

Leckband et Langer, 1991, grâce à des protéines marquées, ont pu montrer que la désorption de molécules non liées de façon covalente sur des supports d'agarose suivait une loi cinétique du premier ordre et que la vitesse de désorption était apparemment plus rapide que la vitesse de coupure des liaisons covalentes. Ainsi :

$$P = P_{\infty} [1 - \exp(-kt)]$$

avec :

P : pourcentage perdu par désorption à l'instant t

P_{∞} : pourcentage total perdu au temps $t = \infty$

k : constante de vitesse (s^{-1})

Dans le cas où le ligand est multivalent, les mêmes auteurs indiquent qu'un retard initial peut intervenir car il y aurait plusieurs points d'adsorption.

Schrader et Block, 1971, avaient déjà émis l'hypothèse d'une équation de ce type (forme exponentielle) pour expliquer la désorption de molécules sur des fibres de verre.

CHAPITRE II

**Fixation du fluorophore sur la surface :
Greffage chimique et Etude photophysique**

II.1. OBJECTIF DE L'ETUDE

Avant de présenter les études relatives à la fixation de la sonde sur la surface, il convient de rappeler le sens accordé aux termes utilisés dans la suite.

Nous avons choisi d'appeler greffage l'ensemble des trois étapes chimiques (activation, silanisation et couplage) décrites dans le chapitre I. Nous entendons par couplage, la liaison chimique covalente entre la sonde et le bras espaceur.

L'adhésion physique ou adsorption de cette molécule sur la surface, c'est-à-dire l'association par des liaisons autres que covalentes ne sera pas considérée comme faisant partie du greffage.

Ainsi, lors de la modification de la surface par un traitement chimique, une molécule sera fixée ou liée s'il y a existence :

- soit d'une liaison chimique de type covalente,
- soit d'une liaison faible intermoléculaire (adsorption).

Afin d'obtenir, d'une part une surface modifiée par une molécule dont les propriétés photoniques vont permettre de quantifier rapidement la présence d'oxygène, et d'autre part un greffage stable dans un milieu liquide turbulent, nous avons divisé notre étude en deux parties successives :

- i) la mise en place d'une méthode d'immobilisation de l'acide 4-(1-pyrényl)butyrique, dont les propriétés de fluorescence (rendement quantique élevé, inhibition très forte par l'oxygène) vont conduire non seulement à la quantification du greffage, et donc à son optimisation, mais aussi à la modélisation du phénomène d'adsorption,
- ii) la détermination de la méthode d'immobilisation offrant la plus grande stabilité sous un courant d'eau.

II.2. IMMOBILISATION

Comme nous l'avons détaillé dans le § I.1, la modification des surfaces en silice par des silanes a lieu via les silanols et nécessite deux, voire trois opérations successives (activation des silanols, silanisation et éventuellement couplage entre le silane immobilisé et une molécule fonctionnelle).

II.21. Conditions expérimentales

A la lecture des publications, nous avons pu constater l'ampleur du domaine des réactifs et des conditions de réaction pour les trois opérations constituant le greffage. Les possibilités offertes étant considérables, nous avons choisi de modifier la surface en utilisant les réactifs et les conditions de réaction mises en œuvre dans notre groupe [Grondin, 1994 et Mahieuxe, 1995] ainsi que le protocole expérimental décrit par Wolfbeis et al. (1984). En effet, ces derniers ont mis au point un capteur permettant de déterminer la pression partielle en oxygène dans un courant gazeux par mesure de l'inhibition de fluorescence de l'acide 4-(1-pyrényl)butyrique greffé sur une plaque en verre.

II.211. Choix initial de la surface

Dans sa phase finale d'utilisation, la surface doit être transparente pour laisser passer les rayons lumineux excitateurs et émis. Elle doit permettre une modification de sa surface, en particulier, elle doit comporter un minimum de silanols de surface. Pour cela, nous avons choisi d'étudier dans un premier temps, deux qualités de surfaces : en verre (lames de microscope) ou en silice pure (fenêtres de cuve utilisée en spectrophotométrie). Les surfaces se présentent sous la forme de plaques rectangulaires dont les dimensions différentes en fonction de la qualité (verre ou silice pure) sont déterminées, pour chacune, à l'aide d'un pied à coulisse.

II.212. Activation

Nous avons vu (§ I.112) que la surface pouvait être activée de plusieurs manières : thermiquement, chimiquement ou grâce à des ultrasons. Nous avons choisi d'effectuer un traitement chimique avec un mélange d'acides. En effet, une étude récente réalisée au GRAPP [Mahieuxe, 1995], concernant le greffage de fibres optiques pour l'analyse de nitrates, a montré qu'une activation par un acide était la meilleure façon d'obtenir un greffage maximal.

Cette première étape de la modification de la surface est donc réalisée dans un mélange d'acides nitrique et sulfurique (10 mL par plaque, v/v, 1/1). La réaction est conduite une heure, à reflux (environ 90°C), sous agitation, dans le dispositif expérimental décrit sur la figure (II).3. A la fin de cette opération, la surface est rincée à l'eau puis à l'acétone et elle est placée pendant une nuit dans une étuve à 105°C.

Nous avons conservé ce type de traitement pour chaque opération.

II.213. Silanisation

La deuxième étape de la modification a été décrite dans le § I.12.

Le silane choisi est le 3-aminopropyltriéthoxysilane (APTES) en raison de sa facilité de mise en œuvre (forme liquide) et de son utilisation importante dans l'industrie. Il comporte trois groupes réactifs éthoxy et une chaîne propyle ayant à son extrémité une fonction amino (figure (II).1).

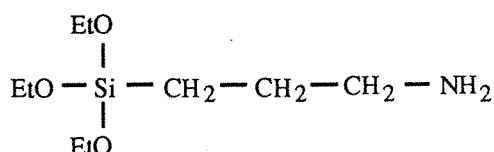


Figure (II).1.
Formule chimique du 3-aminopropyltriéthoxysilane (APTES).

La liaison obtenue avec les groupes -OH de la surface est une liaison de type siloxane avec départ d'éthanol. En absence totale d'eau, un seul éthoxy réagit avec un seul silanol selon le schéma réactionnel suivant :

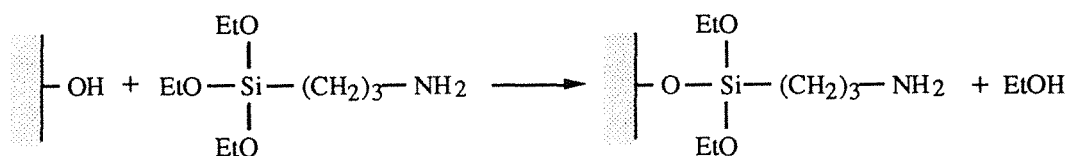


Figure (II).2.
Schéma réactionnel de la silanisation avec l'APTES : cas de conditions strictement anhydres.

a) *Dispositif expérimental*

Il est constitué de deux réacteurs associés à un système de refroidissement. Ceci permet de greffer simultanément deux plaques (figure (II).3).

Dans le cas d'une silanisation en milieu anhydre, l'azote utilisé passe au préalable dans un tube rempli de P_2O_5 pour enlever toute trace d'eau résiduelle, avant d'atteindre l'atmosphère réactionnelle.

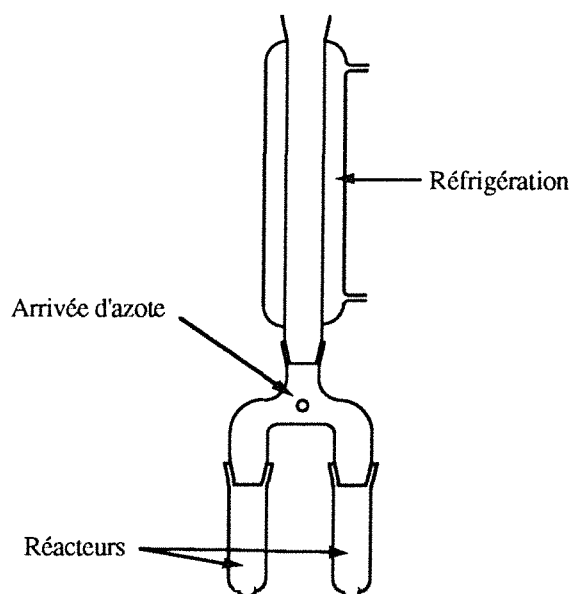


Figure (II).3.
Dispositif expérimental pour la modification de la surface.

b) *Conditions expérimentales et notations*

Nous utilisons un silane ayant trois groupes réactifs éthoxy et comme nous l'avons vu au § I.311, la silanisation peut produire plusieurs types de surfaces suivant la teneur en eau dans le milieu réactionnel. Ainsi, plusieurs types de silanisation pourront être envisagés (cf. tableau récapitulatif (II).1).

b₁) Solvant

Le solvant choisi est le toluène. Ce choix a été guidé par les recherches bibliographiques (tableau (AI).1, annexe I) qui ont permis de constater que, mis à part le cas où la silanisation est réalisée en milieu aqueux, l'usage de l'APTES est automatiquement couplé à celui du toluène.

La réaction s'effectue à 70°C, pendant 5 h sous agitation. La concentration en APTES représente 10 % en volume. A la fin de chaque opération, la surface est rincée avec du toluène et de l'acétone puis séchée à l'air.

b₂) Catalyseurs

Nous avons constaté dans les publications l'utilisation de catalyseurs de la réaction de silanisation avec l'APTES (cf. § I.314) et avons envisagé leur emploi.

- Chlorure de *para*-toluènesulphonyle [Kawabata et al., 1987 ; Urbano et al., 1984] 1 g/L est ajouté dans le milieu réactionnel, en même temps que le silane ainsi qu'1 µL de pyridine et la silanisation a lieu pendant 5 h à 70°C.

- Triéthylamine [Blitz et al., 1988_a, Kallury et al., 1994]

La triéthylamine, 5 % en volume, est ajoutée au toluène avant la silanisation. La surface est alors immergée pendant 1 h à température ambiante avant d'ajouter l'APTES et de réaliser la réaction à 70°C pendant 5 h.

b3) Notations

Pour plus de facilité lors des descriptions ultérieures des différents types de silanisation réalisés, nous avons utilisé des notations déterminant les conditions expérimentales. Elles sont regroupées dans le tableau (II).1.

Tableau (II).1.
Notations utilisées pour différencier les modes de silanisation.

Notations	Types de silanisation	Conditions expérimentales
a	anhydre	- verrerie et produits totalement secs - silanisation sous courant d'azote
e	présence d'eau	- aucune précaution particulière
ha	polymérisation horizontale du silane en milieu anhydre	- verrerie et produit totalement secs - silanisation sous courant d'azote - hydratation de la surface par immersion dans l'eau pendant 30 s avant la silanisation et séchage rapide
he	polymérisation horizontale du silane en présence d'eau	- aucune précaution particulière - hydratation de la surface par immersion dans l'eau pendant 30 s avant la silanisation et séchage rapide
c _{1a}	présence de chlorure de <i>para</i> -toluènesulfonyle pour une silanisation en milieu anhydre	- verrerie et produit totalement secs - silanisation sous courant d'azote
c _{2e}	présence de triéthylamine pour une silanisation en milieu non anhydre	- aucune précaution particulière

II.214. Couplage

a) Principe

La molécule fluorescente choisie est l'acide 4-(1-pyrényl)butyrique (figure (II).4).

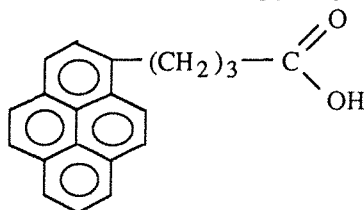


Figure (II).4.

Formule chimique de l'acide 4-(1-pyrényl)butyrique.

Le couplage entre les fonctions amino du silane et acide du fluorophore est réalisé selon les schémas classiques de liaisons pour les peptides, à savoir en présence de carbodiimide (ici le 1,3-dicyclohexylcarbodiimide, DCCI) qui active la partie acide [Sharma et al., 1982] (figure (II).5a). Le caractère acide faible de l'hydroxybenzotriazole (HOBT) permet d'obtenir un ester activé (figure (II).5c) qui améliore la fixation finale [Bosshard et al., 1973] (figure (II).5b).

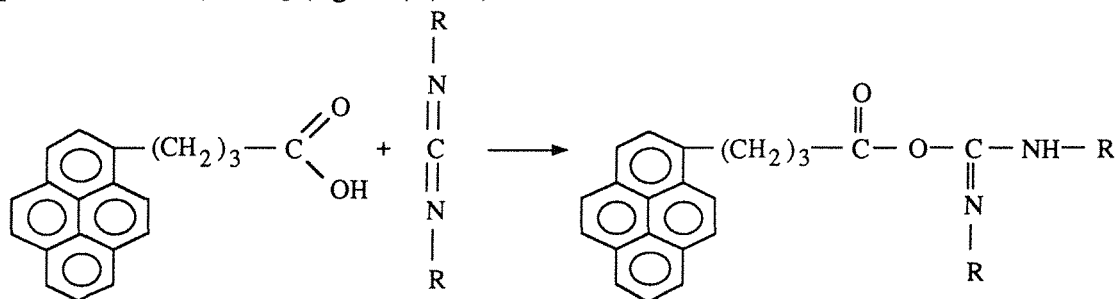


Figure (II).5a.

Activation de la fonction acide du fluorophore.

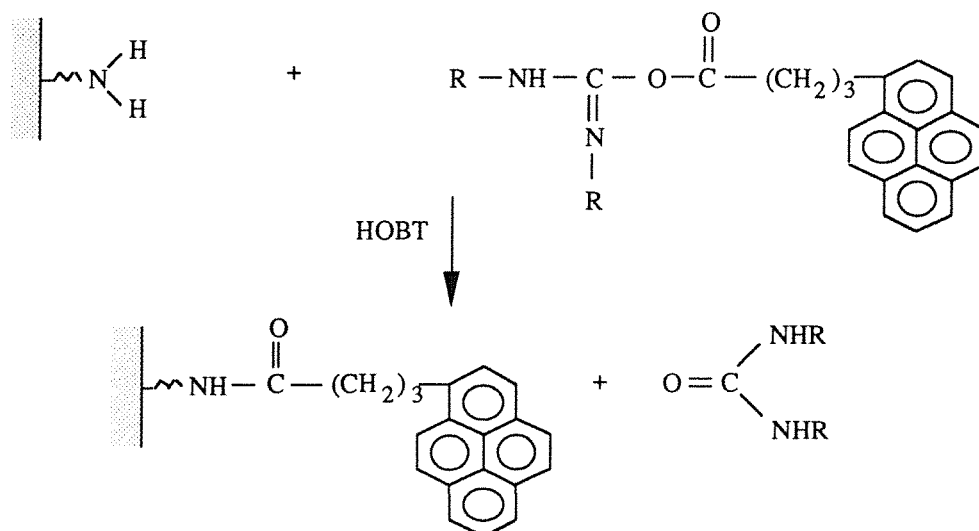


Figure (II).5b.

Fixation finale sur la surface.

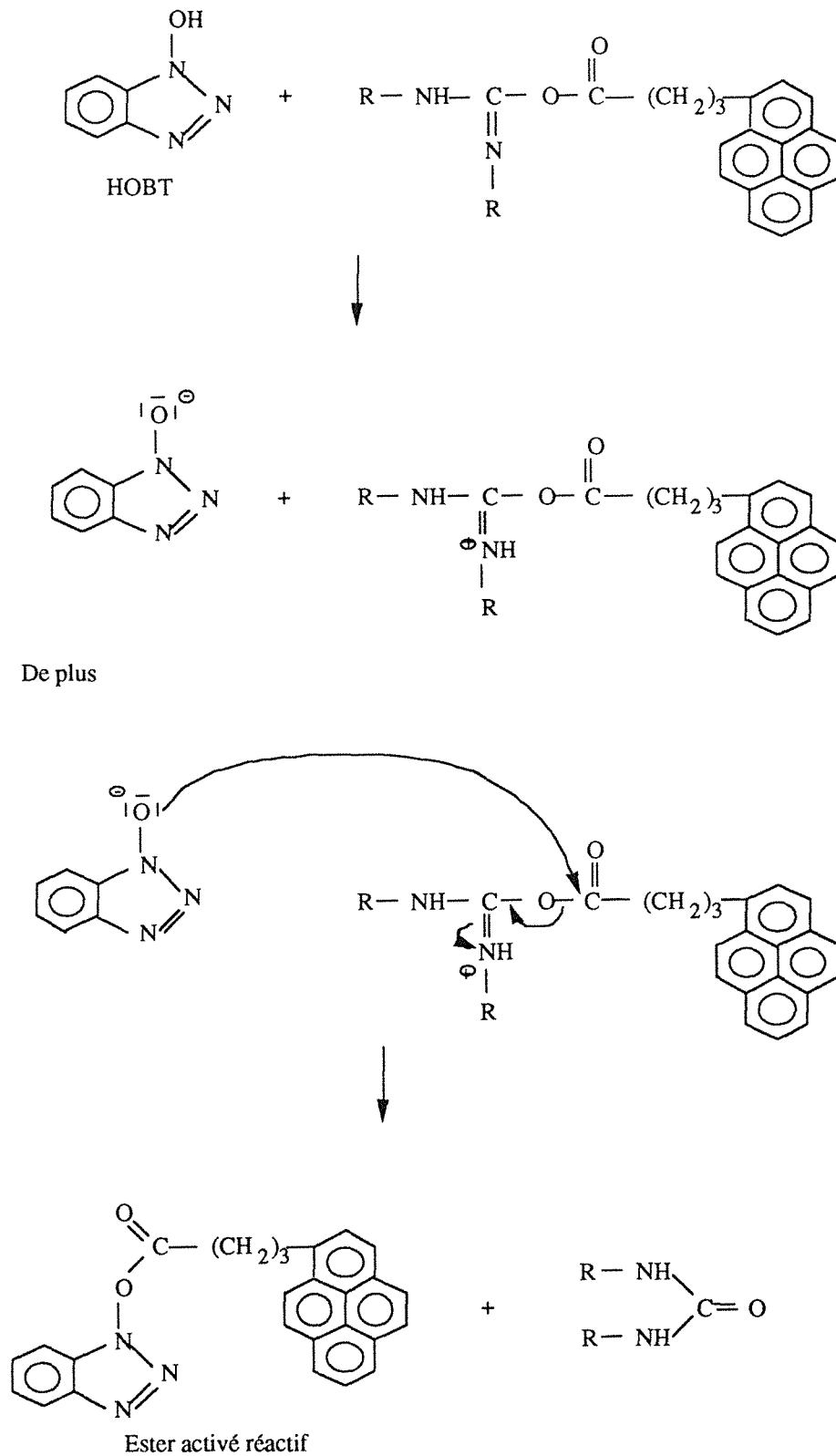


Figure (II).5c.
Action de l'HOBT dans le couplage.

b) Conditions expérimentales

Les quantités utilisées ont été fixées dès le départ, identiques à celles utilisées par Wolfbeis et al. (1984).

La réaction a lieu à température ambiante sous légère agitation pendant 24 h et dans un réacteur identique à celui utilisé pour la silanisation, contenant 10 mL de toluène sec. Les concentrations des différents produits sont les suivantes :

- $7,40 \cdot 10^{-2}$ mol/L pour l'HOBT,
- $4,85 \cdot 10^{-2}$ mol/L pour le DCCI,
- $3,47 \cdot 10^{-2}$ mol/L pour l'APB.

Ces quantités correspondent à 100 mg de chaque produit pour un volume de 10 mL de toluène. Les surfaces sont ensuite rincées à l'acétone.

II.22. Adsorption physique

Nous avons constaté l'adsorption physique du fluorophore sur la surface alors que Wolfbeis et al. (1984) n'en font pas état, bien que la structure à électrons délocalisés de l'APB facilite ce phénomène.

Dans le § I.412, nous avons détaillé quelques possibilités permettant d'enlever les protéines adsorbées, voire d'éviter l'adsorption. Ainsi, avons nous cherché quelle serait la meilleure façon de s'affranchir du dépôt d'APB parasite pour la suite de notre étude.

Une étude préalable réalisée au GRAPP [Grondin, 1994] a montré que le N,N-diméthylformamide (DMF) était un bon solvant qui permettait de désorber l'APB une fois celui-ci déposé sur la surface de fibres optiques après greffage.

II.3. ANALYSE QUALITATIVE DE LA SURFACE GREFFEE

II.31. Objectif

Le principal objectif de cette analyse est de "voir l'état" de la surface greffée. Ceci peut être effectué de plusieurs manières. Nous avons présenté (cf. chapitre I et annexe II) les différentes techniques permettant de "visualiser" les surfaces. Dans notre cas, nous éviterons celles qui détériorent la couverture de la surface. De plus, la présence d'une molécule fluorescente permet l'utilisation de techniques comme la microscopie par fluorescence et/ou la fluorimétrie.

Nous avons choisi de qualifier le greffage au moyen de plusieurs outils, disponibles au laboratoire (sauf la microscopie par fluorescence, disponible à l'INSERM, équipe de M. Donner, Nancy) :

- la spectroscopie IR,
- la fluorimétrie,
- la microscopie par fluorescence,
- la microscopie à force de cisaillement.

Dans le cas de la spectroscopie IR et de la microscopie à champ proche, nous aurons la possibilité de suivre l'évolution de la surface après chacune des étapes du greffage, car ces deux méthodes ne reposent pas sur la fluorescence. Au contraire, la fluorimétrie et la microscopie par fluorescence n'offriront qu'une seule possibilité, celle d'observer la surface une fois le greffage terminé.

II.32. Analyse par spectroscopie IR

Bien que réalisée sur des surfaces en silice, matériau qui absorbe en dessous de 2000 cm^{-1} , il est quand même intéressant de pouvoir suivre l'évolution des pics situés dans la région entre 2800 et 3600 cm^{-1} . En effet, les molécules intervenant dans la modification de la surface ont des groupements facilement détectables grâce à leurs fréquences de vibration :

- OH libre : 3600 cm^{-1} ,
- NH_2 (deux bandes) du silane : $3500\text{-}3400\text{ cm}^{-1}$,
- $\text{>CH-(CH}_2\text{)}_n\text{-}$ de l'APB : $2800\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$.

II.321. Conditions expérimentales et mode opératoire

Un spectrophotomètre infrarouge Perkin-Elmer modèle 1310 est utilisé.

Une plaque en silice pure est greffée suivant le mode ha (cf. tableau (II).1, récapitulatif des différentes notations). Elle est maintenue perpendiculairement au faisceau incident qui la traverse avant d'être analysée. Entre chaque étape de la modification de la surface (activation, silanisation et couplage), une analyse est effectuée.

II.322. Résultats

Les spectres ne sont pas probants. Un phénomène de saturation du pic de la fonction -OH est observé. Il semble dû à l'épaisseur de la plaque à traverser (environ 1 mm).

Il cache ainsi l'apparition de la fonction -NH_2 du silane. Cependant, dans le spectre présenté sur la figure (II).6, spectre obtenu après la dernière étape du greffage, nous pouvons observer un ensemble de pics entre 2800 et 3000 cm^{-1} , témoins de la présence d'une structure comportant des liaisons carbone-carbone.

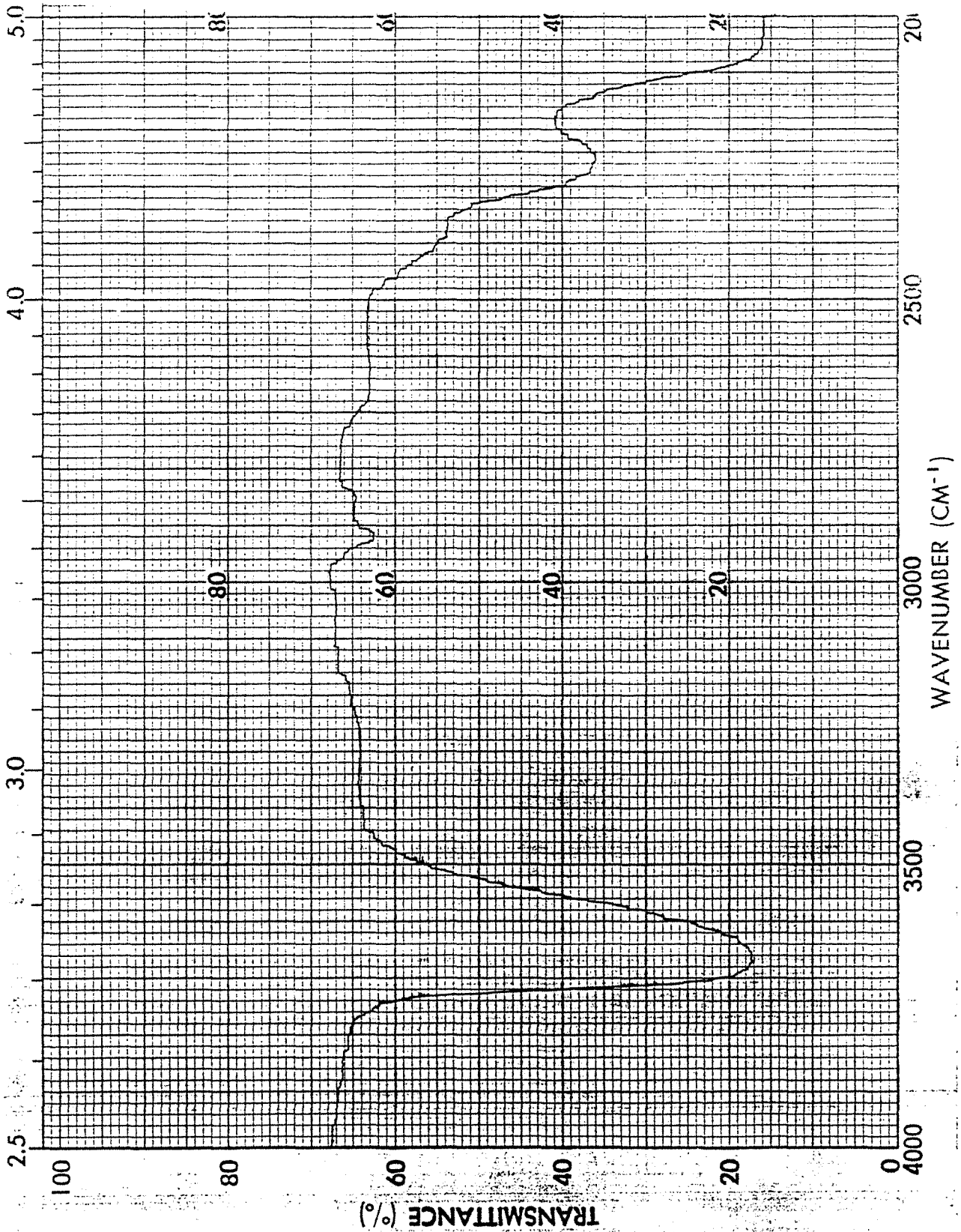


Figure (II).6.
Spectre IR d'une plaque greffée avec une silanisation de type ha
Présence de pics faibles dans la région 2800-3000 cm^{-1} .

II.33. Analyse par fluorimétrie

Cette analyse, par fluorescence de l'APB (cf. annexe III), permet de mieux évaluer les qualités de fluorescence de la surface greffée. Dans un premier temps, nous avons comparé les spectres d'APB greffé et libre. Ensuite, nous avons cherché à mesurer l'intensité de fluorescence de l'APB en milieu sec.

II.331. Conditions expérimentales et mode opératoire

L'appareil de mesure utilisé est un spectrofluorimètre SPEX 1681 Fluorolog (cf. annexe III).

a) Comparaison entre APB libre et greffé

Une plaque en silice est modifiée suivant le mode c_{2e} (c'est-à-dire avec la triéthylamine en tant que catalyseur). Ensuite, elle est traitée par une solution de DMF pour enlever les molécules adsorbées. L'analyse fluorimétrique (obtention du spectre d'émission de fluorescence pour une excitation à 337 nm) est réalisée par excitation directe de la plaque immergée dans 2,5 mL d'eau déminéralisée. Parallèlement, une solution d'APB dans l'eau légèrement basique dont la concentration est inférieure à 10⁻⁷ mol/L, est analysée dans les mêmes conditions.

Une remarque importante est à signaler : il n'est pas possible de relier directement l'intensité de fluorescence de l'APB greffé sur une surface plongée dans l'eau à une quelconque concentration en molécules greffées par l'intermédiaire d'une courbe étalon donnant les quantités d'APB présentes dans l'eau en fonction de l'intensité de fluorescence, ceci pour deux raisons : la première est que sur la plaque, l'intensité est mesurée en milieu hétérogène (surface solide au contact d'un liquide) et la deuxième est que la surface excitée est petite et le greffage non obligatoirement homogène (donc pas d'extrapolation possible).

b) Mesure de l'intensité en milieu sec

Un premier spectre d'émission de fluorescence est obtenu sur une plaque en silice vierge. Elle est ensuite greffée suivant le même mode qu'en a). Enfin, l'analyse fluorimétrique est réalisée directement sur la plaque non immergée.

II.332. Résultats et discussion

Les spectres d'émission de fluorescence d'APB greffé et libre sont représentés sur la figure (II).7 (spectres A et B respectivement). Nous pouvons observer un déplacement bathochrome de 2 nm dans le spectre de l'APB greffé. Ainsi, les pics se situent à 377, 397 et 419 nm au lieu de 375, 395 et 417 nm.

Ce type de déplacement a déjà été observé par Wolfbeis et al., 1984, pour le même fluorophore immobilisé de façon covalente avec l'APTES sur des plaques en verre. Les auteurs observent un déplacement vers le rouge de 6 à 8 nm pour les spectres d'excitation et d'émission d'APB greffé. Ce phénomène n'est cependant pas général. En effet, Urbano et al., 1984, n'observent aucun déplacement lors du greffage d'une autre molécule, l'acide 3-(10-méthylacridinium-9-yl)propionique sur des lames en verre (lame de microscope). Ils constatent que le spectre est identique, ce qui indique qu'il n'y aurait aucune interaction entre le verre et les molécules greffées.

La présence d'un pic vers 370 nm, dans le spectre A est dû à la diffusion Raman de la plaque qui peut être mise en évidence en changeant la longueur d'onde d'excitation induisant un déplacement du pic d'émission.

La déformation au-dessus de 450 nm dans le spectre A n'est pas due à la présence d'excimère. En effet, nous avons effectué sur cette même plaque, positionnée différemment cependant, une mesure avec (et sans) un filtre pour le faisceau d'excitation à 337 nm. Le résultat reporté sur la figure (II).8 (spectres C et D) montre que la partie au-dessus de 450 nm est due à la lumière parasite provenant de la lampe excitatrice du SPEX. Ce phénomène est d'autant plus accentué que la plaque, placée à 45° du faisceau excitateur, réfléchit la lumière incidente vers le détecteur de fluorescence placé à 90° de l'excitation (cf. annexe III).

La mesure de l'intensité de fluorescence est aussi possible dans l'air (figure (II).9). Le spectre E, spectre de fluorescence de l'APB dans l'air montre une structure proche de celle de l'APB dans l'eau. Le spectre F, quant à lui, a été réalisé sur la même plaque mais sans aucun greffage. Nous pouvons remarquer ici la présence des deux types de structures déjà notées précédemment, à savoir, le pic Raman de la plaque à 370 nm et la structure parasite au-dessus de 450 nm. Ces pics observés ne sont pas dus au greffage.

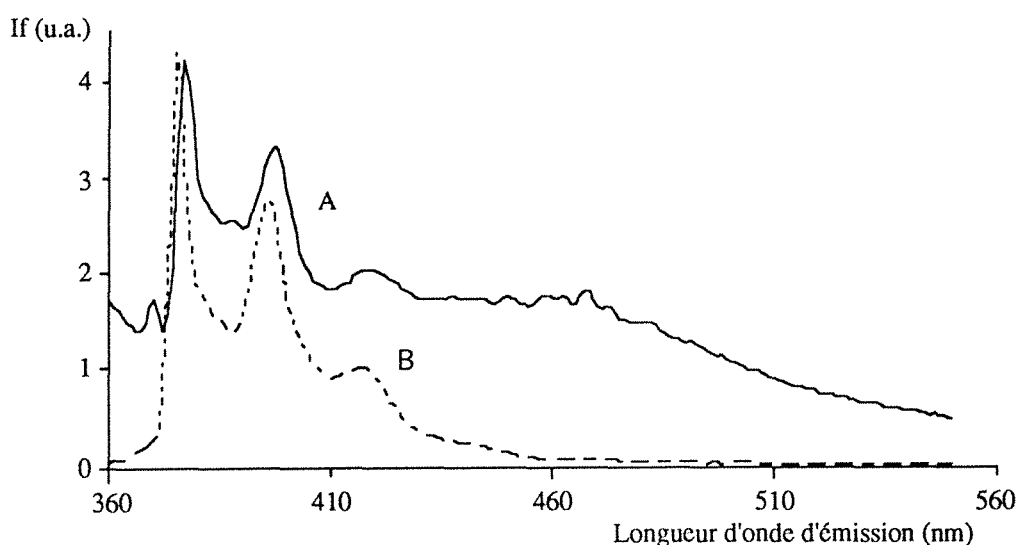


Figure (II).7.
Spectres d'émission de fluorescence pour une excitation à 337 nm
A - APB greffé et B - APB libre.

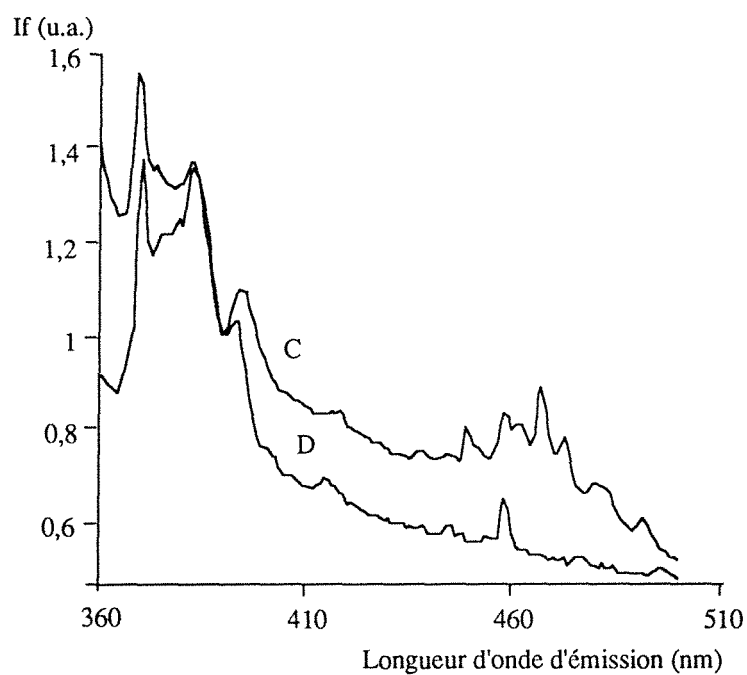


Figure (II).8.
Spectres d'émission de fluorescence d'APB greffé excité à 337 nm
C - sans filtre à l'excitation et D - avec filtre à l'excitation.

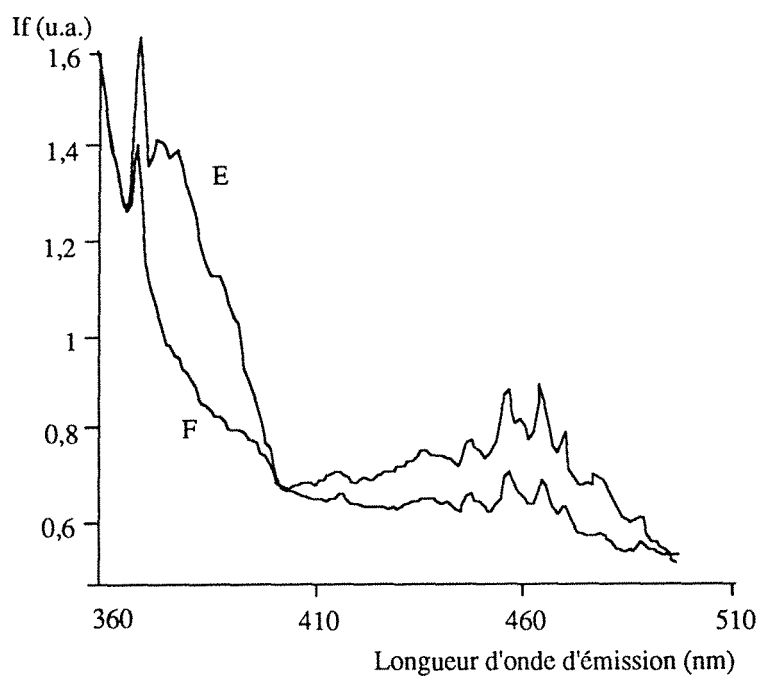


Figure (II).9.
Spectres d'émission de fluorescence de l'APB pour une excitation à 337 nm
E - plaque greffée dans l'air et F - plaque non greffée dans l'air.

II.34. Analyse par microscopie en fluorescence

Le microscope fluorescent permet de visualiser directement l'état de la surface modifiée par l'émission de la fluorescence des molécules liées à la suite d'une excitation à une longueur d'onde convenablement choisie.

II.341. Conditions expérimentales et mode opératoire

Une plaque en silice est modifiée suivant le mode ha, puis elle subit un traitement de désorption au DMF. Elle est ensuite analysée au microscope fluorescent. Le grandissement est x 200.

II.342. Résultats

Le microscope fluorescent va faire ressortir les molécules d'APB sur les clichés. La figure (II).10 montre les taches les plus claires qui correspondent à des agrégats d'APB greffé. Nous observons aussi des courbes foncées qui séparent des zones d'égale couleur. Ce sont les surfaces en silice qui laissent passer les rayons excitateurs. Les zones de couleur intermédiaire correspondent à une surface homogène silanisée et greffée.

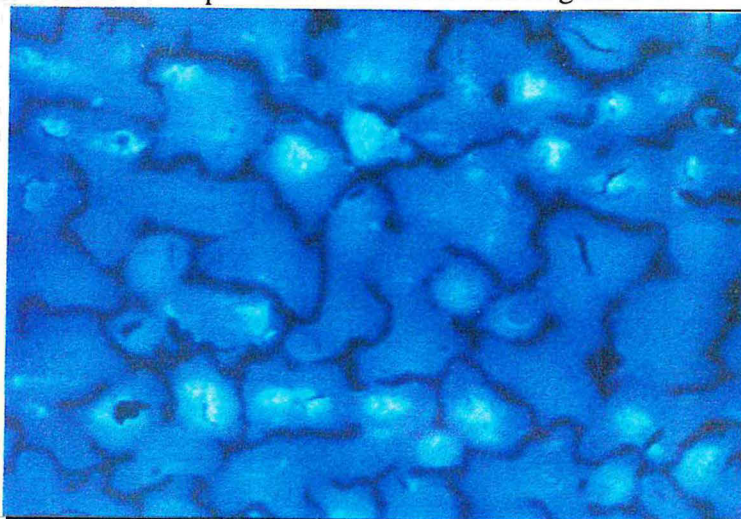


Figure (II).10.

Image au microscope fluorescent d'une surface greffée avec une silanisation ha - x 200.

Le cliché démontre que le mode de silanisation choisi (ha) confère à la surface une homogénéité de la couverture par les molécules fluorescentes.

Comme le laboratoire venait d'acquérir un outil beaucoup plus performant (la microscopie à force de cisaillement), nous avons opté plutôt pour cette technique que de continuer dans cette voie.

II.35. Analyse par microscopie à force de cisaillement

La microscopie à force de cisaillement est un outil performant pour évaluer l'état de la surface. En effet, le système d'analyse, constitué d'une pointe (fibre optique) balayant une aire déterminée, permet d'obtenir des images reflétant la topographie.

L'étude développée ici, se divise en deux parties. Afin de suivre pas à pas la modification de la surface pour un mode de silanisation donné, nous avons dans un premier temps, effectué une analyse entre chaque étape du greffage. Ensuite, pour essayer de comparer les différents types de silanisation, nous n'avons analysé que les surfaces en phase finale.

II.351. Conditions expérimentales et mode opératoire

a) Cas du suivi de la modification

Une plaque en silice pure a été marquée par un crayon à mine de diamant pour permettre de fixer une surface d'analyse identique après chaque étape. La plaque est greffée suivant le mode ha.

Nous avons effectué une analyse après chacune des trois étapes qui constituent la modification de la surface, soit : une avant tout traitement, une après l'activation, une après la silanisation et une après le couplage. Ceci dans le but de s'assurer de l'homogénéité des réponses.

b) Cas des différents types de silanisation

La même plaque en silice est utilisée mais elle subit entre chaque greffage, un nettoyage à la soude 1 M pendant 48 h, pour enlever toute trace de molécules présentes sur la surface.

Les types de silanisation suivants ont été étudiés :

- silanisation de type a,
- silanisation de type e,
- silanisation de type ha
- silanisation de type c₁a,
- silanisation de type c₂e.

La plaque est analysée immédiatement après la silanisation.

II.352. Résultats

a) Suivi de la modification

Les figures (II).11. a, b, c et d montrent les différents états de surface obtenus après chaque traitement pour un même point sur la plaque.

Avant tout traitement, et suite à l'activation par un milieu acide, la surface apparaît sans rugosité.

La silanisation de type ha conduit à un recouvrement homogène de la surface mais non total puisqu'il reste des endroits où la surface "brute" apparaît.

Enfin, sur la dernière image (figure (II).11.d), l'ajout du fluorophore n'a pas changé l'aspect. Seules les parties silanisées sont greffées. Le fluorophore ne semble pas se déposer là où la surface n'est pas silanisée (les parties plus foncées sans silane apparaissent sans APB).

b) Etude de différents types de silanisation

b₁) Silanisation a

La figure II.12 montre l'état de la surface silanisée selon le type a. Il apparaît clairement que ce type de silanisation produit une surface recouverte de façon inhomogène comme nous l'attendions et qu'il reste de nombreux endroits nus sans silane. Ceci s'ajoute à l'aspect de la surface à l'œil nu juste après le traitement : la plaque est transparente et lisse comme si il n'y avait eu aucune modification.

b₂) Silanisation e

La figure (II).13 montre l'état de la surface silanisée selon le type e.

Lorsque la plaque silanisée a été lavée au toluène et à l'acétone, la surface est apparue granuleuse à l'œil nu, recouverte de fines particules blanches qui n'ont pas été éliminées au lavage. Ceci laisse présager, bien avant l'analyse, une surface formée d'un film polymère multicouches.

L'analyse de l'image révèle la présence de globules polymères larges et dispersés dont les dimensions sont variables (axe long de 5 à 15 μm et axe court de 2 à 5 μm).

b₃) Silanisation ha

La figure (II).14 montre l'état de la surface après silanisation selon le type ha.

A l'œil nu, la plaque présente un voile blanchâtre. Comme nous l'attendions, la silanisation ha est associée à une surface contenant de petits globules de polymères dispersés de façon homogène et de taille plus réduite (jusqu'à 3 μm de diamètre).

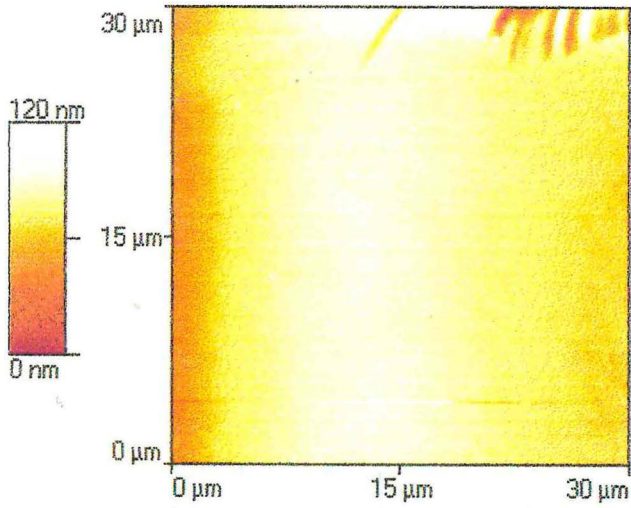


Figure (II).11.a.
Microscopie à force de cisaillement :
Etat de la surface avant tout traitement.

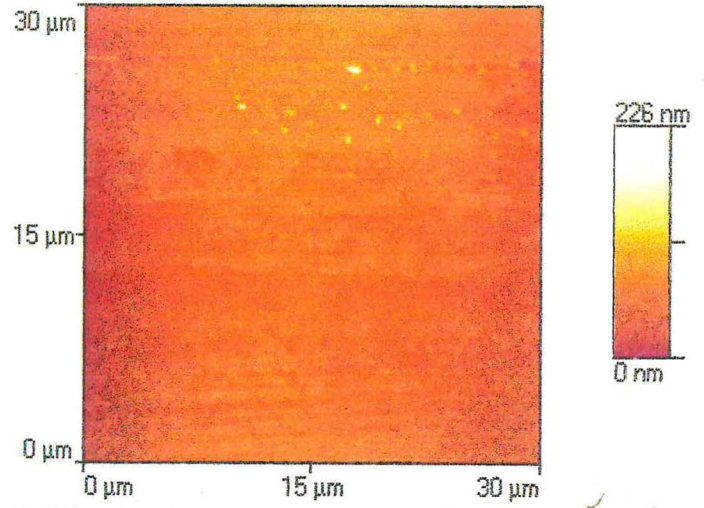


Figure (II).11.b.
Microscopie à force de cisaillement :
Etat de la surface après une activation dans un milieu acide.

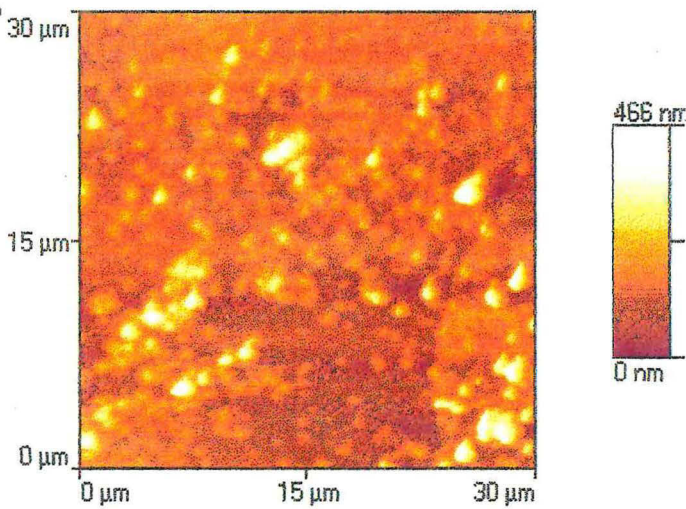


Figure (II).11.c.
Microscopie à force de cisaillement :
Etat de la surface après une silanisation de type ha.

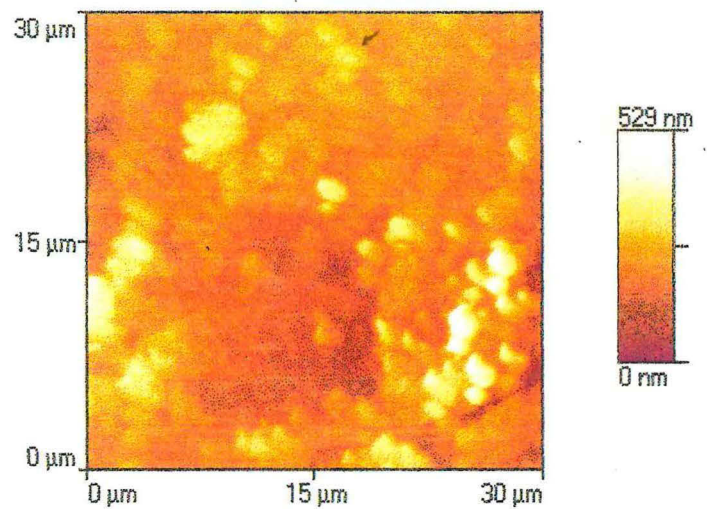


Figure (II).11.d.
Microscopie à force de cisaillement :
Etat de la surface après le couplage avec l'APB.

b4) Silanisation c_{1a}

La surface présente une homogénéité comparable à celle observée dans le cas d'une silanisation de type ha (à l'oeil nu) mais des globules beaucoup plus volumineux n'ont pas permis de réaliser l'analyse par microscopie optique à champ proche. Ainsi, avons-nous remarqué qu'à l'approche de la pointe sur la surface, les globules se déformaient ce qui conduit à penser que le recouvrement de la surface n'est pas rigide mais est constitué d'un film polymère qui peut s'affaisser facilement. La présence de chlorure de *para*-toluènesulphonyle engendre certes une homogénéité de la surface mais ce catalyseur entraîne apparemment une trop forte réactivité des sites amine et conduit à des globules polymères qui se développent en dehors de la surface.

b5) Silanisation c_{2e}

La figure (II).15 montre l'état de la surface après une silanisation de type c_{2e}. L'aspect de la surface est intermédiaire entre une silanisation e (même type de globules mais environ deux fois plus petits) et une silanisation ha (distribution homogène). Ceci indique :

- i) que la présence d'eau engendre une formation de type polymère,
- ii) que le catalyseur inhibe légèrement ce phénomène et favorise l'ancrage en plusieurs points.

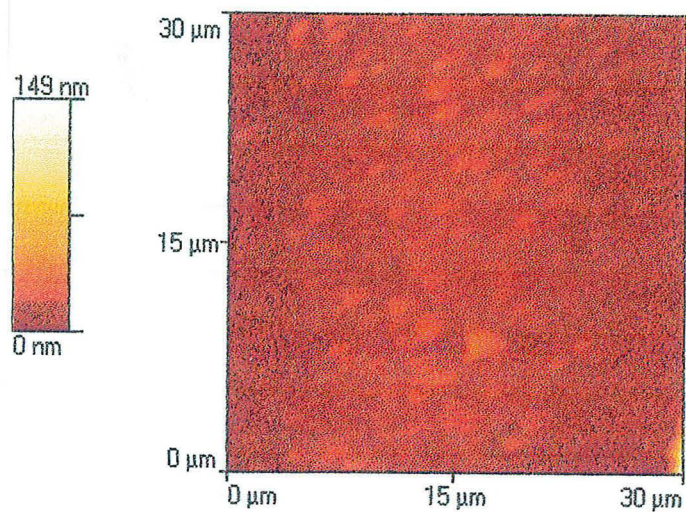


Figure (II).12.
Microscopie à force de cisaillement :
Etat de la surface après une silanisation
de type a.

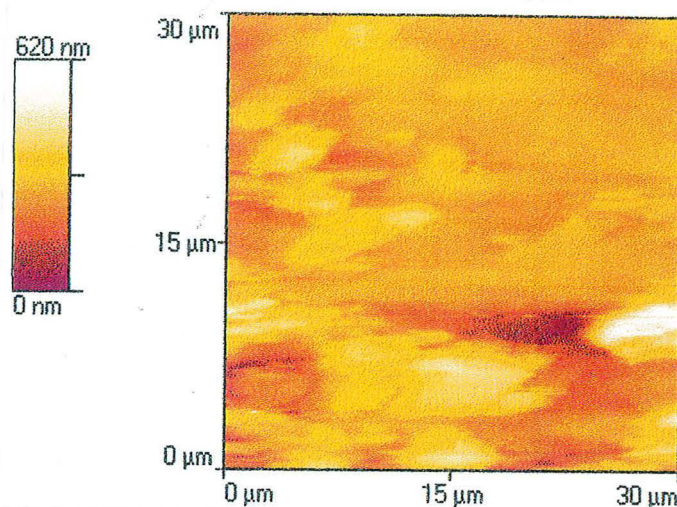


Figure (II).13.
Microscopie à force de cisaillement :
Etat de la surface après une silanisation
de type e.

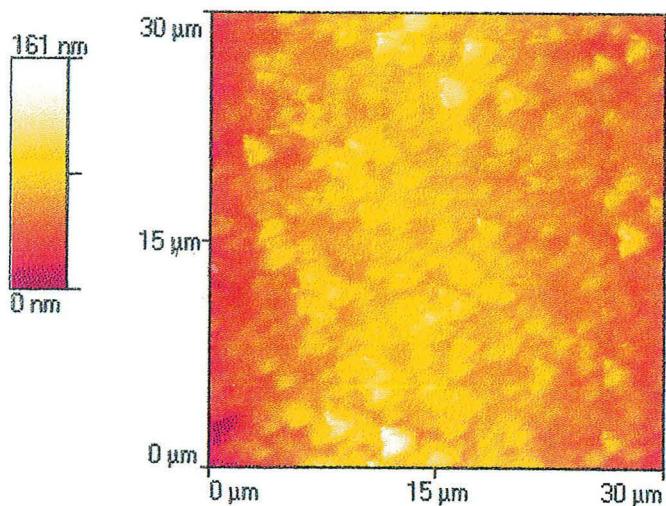


Figure (II).14.
Microscopie à force de cisaillement :
Etat de la surface après une silanisation
de type ha.

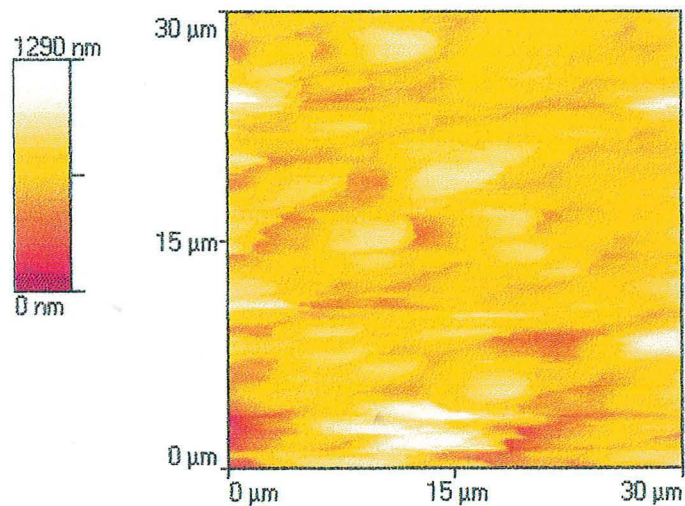


Figure (II).15.
Microscopie à force de cisaillement :
Etat de la surface après une silanisation
de type c2e.

II.4. ANALYSE QUANTITATIVE DE LA SURFACE GREFFEE

II.41. Objectif

Nous voulons, à terme, optimiser le greffage, c'est-à-dire obtenir une surface modifiée avec un maximum de liaisons covalentes et un minimum d'adsorption. En effet, ce dernier phénomène pourrait entraîner une diminution de la fluorescence indépendante de la présence ou de l'absence d'inhibiteur, par désorption du fluorophore. Pour ce faire, nous avons choisi de déterminer les concentrations surfaciques en fluorophore, ce qui nous permettra de quantifier le greffage.

Puisque les différents modes de silanisation induisent des états de surface différents (cf. § I.311), nous avons cherché à optimiser cette étape. Ainsi, avons-nous greffé des plaques selon les types a, e, ha, he, c₁a et c₂e pour lesquelles nous avons déterminé les concentrations surfaciques que nous avons comparées aux valeurs théoriques.

De plus, nous avons testé deux types de surface : en silice pure (notée s) et des lames de verre classique (notées v).

II.42. Concentration surfacique théorique

Le calcul dépend de la quantité de fonctions amino présentes sur la surface après l'étape de silanisation. Nous avons vu (cf. § I.321) que pour un silane comportant deux ou trois extrémités réactives, la concentration en silane était comprise entre 2 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ (cas où il y a un point d'ancrage) et 4 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ (cas où il y a deux points d'ancrage).

Le raisonnement concernant l'encombrement stérique de la molécule d'APB ne s'applique pas ici. En effet, les calculs suivant les relations données dans le § I.421a, en prenant pour dimensions [Cameron et Trotter, 1965] : axe long $L = 7,02 \cdot 10^{-10}$ m et axe court $l = 4,95 \cdot 10^{-10}$ m, conduisent à des valeurs de concentration surfacique de l'ordre de 4 à 7 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$. Manifestement, ces résultats supérieurs aux quantités précédentes, sont plus à rapprocher d'une couverture de surface de type adsorption physique.

II.43. Concentration surfacique expérimentale

II.431. Principe

La liaison entre le silane portant l'APB et la surface peut être rompue par action d'une base forte. L'estimation des quantités d'APB dégreffées par la solution basique, nous a permis d'évaluer, par fluorescence, la quantité présente sur la surface.

Toutefois, devant l'importance des quantités adsorbées dans certains cas, nous avons divisé l'étude en deux parties :

- désorption des molécules adsorbées (liées faiblement) et détermination de quantités désorbées ($C_{dés}$),
- dégreffage des molécules greffées (liées fortement par covalence) et détermination de la quantité résiduelle ($C_{rés}$).

II.432. Désorption

a) Protocole expérimental

La détermination des quantités adsorbées nécessite plusieurs étapes schématisées sur la figure (II).16. La plaque est immergée dans 10 mL de DMF pendant 2 à 3 jours (étape 1). Ensuite, la solution est analysée par fluorimétrie (étape 2). Tant que cette solution contient des molécules d'APB, la surface est à nouveau immergée dans une nouvelle quantité de DMF (étape 3) et le cycle des étapes 1 à 3 recommence. Si il n'y a plus d'APB dans le DMF, nous supposons que toute la quantité adsorbée est retirée, il ne reste plus qu'à dégreffer les molécules couplées (étape 4, décrite dans le § II.433).

b) Analyse fluorimétrique

L'analyse par fluorimétrie des solutions dans lesquelles ont séjourné les surfaces permet de connaître la quantité de molécules désorbées pour chaque cycle par comparaison avec une courbe d'étalonnage établie au préalable (cf. annexe III).

Chaque quantité est ajoutée à la précédente, ce qui permet de s'affranchir des phénomènes de fluctuation dus à des cycles variables (2, 3 ou 4 jours dans le DMF).

Les résultats sont exprimés en fonction de l'aire de la surface de chaque plaque permettant ainsi d'obtenir une concentration de surface en molécules désorbées, $C_{dés}$.

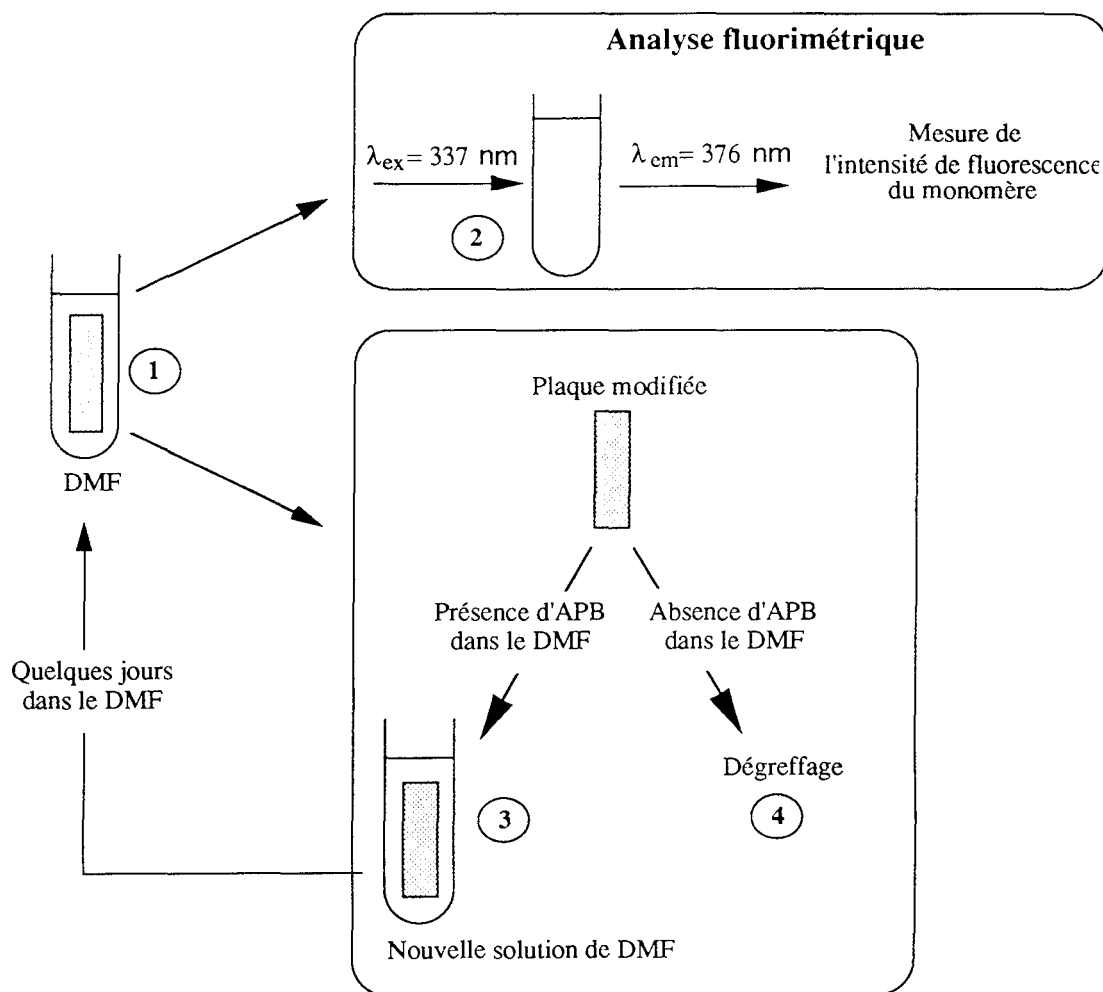


Figure (II).16.
Schéma des étapes de la désorption.

II.433. Dégreffage

a) Protocole expérimental

Lorsque les plaques ont été "nettoyées" par le DMF (plus aucune trace d'APB dans le DMF), elles sont placées dans 10 mL d'une solution de NaOH (1 M) pendant 24 h. Afin de s'assurer que toutes les liaisons ont été coupées, un deuxième traitement dans 10 mL de NaOH est réalisé.

b) Analyse fluorimétrique

L'analyse par fluorimétrie de la solution de NaOH permet de connaître la quantité de molécules dégreffées pour chaque plaque par comparaison avec un abaque établi au préalable (cf. annexe III).

Les résultats sont exprimés en fonction de l'aire de la surface de chaque plaque permettant ainsi d'obtenir une concentration de surface en molécules dégreffées, notée $C_{rés}$, concentration résiduelle.

II.434. Résultats

a) Désorption

Nous avons rassemblé les résultats relatifs à l'action du diméthylformamide sur la surface greffée dans l'annexe IV. Ils sont sous forme de courbes représentant la quantité totale d'acide 4-(1-pyrényl)butyrique désorbé en fonction de la durée du séjour dans le DMF. Ces courbes suivent deux tendances : un comportement de type exponentiel et un comportement mixte, alliant une partie droite et une partie exponentielle. Deux exemples représentatifs sont donnés par les figures (II).17 et (II).18. Les concentrations surfaciques désorbées sont données dans le tableau (II).2.

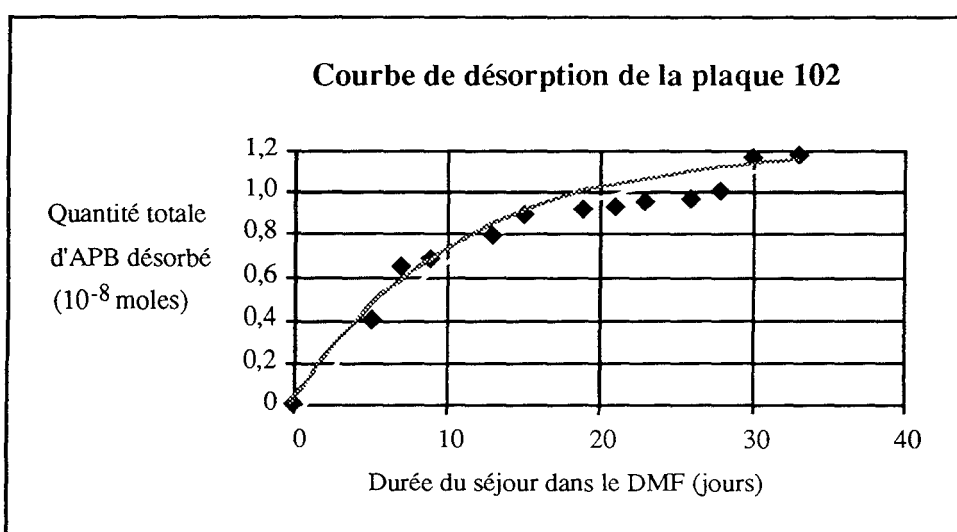


Figure (II).17.

Courbe de désorption montrant un comportement exponentiel.
Plaque en silice, silanisation e.

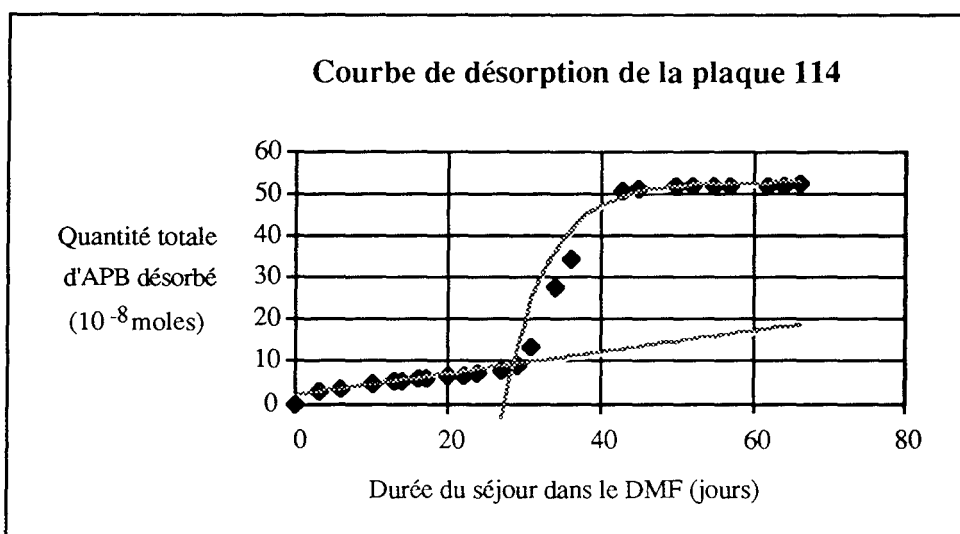


Figure (II).18.

Courbe de désorption montrant un comportement mixte.
Plaque en silice, silanisation ha.

Tableau (II).2.
Quantités d'APB désorbé pour chaque type de surface
et suivant chaque type de silanisation.

	Type de surface	Type de silanisation					
		a	e	c _{1a}	c _{2e}	ha	he
C _{dés} ($\mu\text{mol}/\text{m}^2$)	s	4,58	0,45	2,26	13,34	29,26	48,07
		15,35	421,22	2,02	17,12	146,30	
			9,56			418,81	
	v	3,99	1,41	0,85			31,89
		51,77	32,57			2,52	56,52

b) Dégreffage

Les concentrations résiduelles, calculées après action de la soude sont réunies dans le tableau (II).3.

Tableau (II).3.
Concentrations résiduelles d'APB pour chaque type de surface
et suivant chaque type de silanisation.

	Type de surface	Type de silanisation					
		a	e	c _{1a}	c _{2e}	ha	he
C _{rés} ($\mu\text{mol}/\text{m}^2$)	s	0,45	0,51	5,3	1,56	0,8	0,55
		0,54	0,33	4,9	1,10	0,95	
			0,39			1,01	
	v	0,53	3,4	2,5		0,86	0,62
		0,38	0,45				1,72

II.435. Conclusions

Les différents résultats exprimant respectivement la concentration de désorption et la concentration surfacique sont réunis dans le tableau (II).4.

La première série de valeurs correspond à la quantité de molécules d'APB adsorbées (*i.e.* désorbables) par unité de surface. La deuxième correspond à la quantité de molécules effectivement liées de façon covalente par unité de surface. La troisième série de valeurs définit le pourcentage de liaisons covalentes (C_{rés}) par rapport à la concentration totale (C_{dés} + C_{rés}). C'est la première valeur à optimiser (faible adsorption par rapport aux liaisons covalentes). La dernière série a été calculée en prenant en considération la concentration théorique maximale déterminée pour une monocouche, soit 4 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$. Ce deuxième rapport indique la qualité du greffage : plus la valeur est élevée plus on se rapproche d'une couverture monocouche.

Une première analyse des résultats (quantités désorbées différentes pour un même type de silanisation) indique que les quantités adsorbées sont aléatoires et ne sont ni fonction du type de surface (verre ou silice pure), ni fonction du mode de silanisation (présence ou absence d'eau, catalyseurs, etc.). De ce fait, les pourcentages de liaison covalente (troisième série) sont très divers et ne donnent aucune indication valable puisque venant de valeurs aléatoires. Ainsi, seuls les résultats de la dernière série, correspondant au rapport entre la concentration expérimentale et la concentration théorique calculée pour une monocouche peuvent être considérés comme fiables.

Tableau (II).4.
Concentrations de surface ($C_{dés}$ et $C_{rés}$) pour chaque type de surface suivant chaque type de silanisation.

	Type de surface	Type de silanisation					
		a	e	c1a	c2e	ha	he
$C_{dés}$ ($\mu\text{mol}/\text{m}^2$)	s	4,58 15,35	0,45 421,22 9,56	2,26 2,02	13,34 17,12	29,26 146,30 418,81	48,07
	v	3,99 51,77	1,41 32,57	0,85		2,52	31,89 56,52
$C_{rés}$ ($\mu\text{mol}/\text{m}^2$)	s	0,45 0,54	0,51 0,33 0,39	5,3 4,9	1,56 1,10	0,8 0,95 1,01	0,55
	v	0,53 0,38	3,4 0,45	2,5		0,86	0,62 1,72
Pourcentage de liaisons covalentes $\frac{C_{rés}}{C_{rés}+C_{dés}}$ (%)	s	8,94 3,40	53,1 0,08 3,92	70,10 70,80	10,47 6,04	2,66 0,65 0,24	1,13
	v	11,72 0,73	70,69 1,36	74,63		25,44	1,91 2,95
$\frac{C_{rés}}{C_{théo}}$ (%)	s	11,25 13,5	12,75 8,25 9,75	132,5 122,5	39 27,5	20 23,75 25,25	13,75
	v	13,25 9,5	85 11,25	62,5		21,5	15,5 10

a) Type de surface

Nous pouvons constater qu'il existe une différence entre une surface en silice pure et une surface en verre : dans le premier cas, les concentrations résiduelles sont assez homogènes et mis à part le cas d'une silanisation c_{1a} , elles sont comprises dans le domaine $0,3 - 1,6 \mu\text{mol}/\text{m}^2$. Cette différence peut provenir de la nature de chaque surface. En effet, le verre contient des impuretés (ajout de charges minérales lors de sa fabrication) par rapport à la silice pure, ce qui entraîne une surface non homogène et ainsi une modification de la surface différente (moins de silanols et/ou plus d'hétérogénéités perturbant la silanisation).

Nous avons choisi de tester le verre pour son coût modeste, mais au vu des résultats le choix de la silice s'impose.

b) Type de silanisation

Le choix du type de silanisation est très important car il conditionne les propriétés de la surface, surtout en présence d'un silane ayant trois groupes réactifs sensibles à l'eau (formation d'un polymère de façon non reproductible si le degré d'humidité n'est pas contrôlé).

D'après les concentrations résiduelles, nous obtenons des résultats contraires aux prévisions. En effet, nous attendions une différence entre une silanisation en présence d'eau et une silanisation anhydre, ceci à cause de l'augmentation du nombre de sites réactifs par polymérisation du silane dans le premier cas. Or, les résultats montrent au contraire une homogénéité (valeurs comprises entre $0,3$ et $0,55 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ pour la silice). Ceci laisse à penser que l'enchevêtrement des chaînes dans le polymère est un facteur limitant, ainsi les fonctions amino même si elles sont plus nombreuses, ne sont pas forcément toutes accessibles.

Une silanisation en présence de chlorure de *para*-toluènesulphonyle en milieu anhydre conduit à une surface dont la couverture est supérieure à une monocouche alors qu'en utilisant de la triéthylamine en présence d'eau, la concentration est inférieure à celle d'une monocouche (rappelons que la concentration de surface pour une monocouche a été calculée et est comprise entre 2 et $4 \mu\text{mol}/\text{m}^2$). Il semble cependant judicieux d'utiliser un catalyseur qui promeut nettement le greffage (concentrations surfaciques les plus élevées quel que soit le catalyseur).

Le dernier cas est celui de l'application du phénomène de polymérisation horizontale du silane sur la surface. Même si la concentration de surface n'est pas très élevée, elle est en tous cas inférieure à celle d'une monocouche et apparemment reproductible. En effet, les trois plaques greffées avec ce mode donnent des valeurs résiduelles très proches les unes des autres.

Finalement, deux types de silanisation préférentiels se dégagent :

- une silanisation en présence d'un catalyseur (le chlorure de *para*-toluènesulfonyle),
- une silanisation avec polymérisation horizontale.

II.5. MODELISATION DU PHENOMÈNE DE DESORPTION

II.51. Objectif

Lors de l'étude précédente (cf. § II.4), nous avons constaté l'existence du phénomène d'adsorption de l'APB sur la surface, phénomène décrit par ailleurs dans le cas de protéines. Bien que les concentrations de désorption soient hétérogènes (cf. § II.434.a), nous avons pu remarquer un comportement identique en fonction du temps.

Leckband et Langer (1991) ont avancé un modèle théorique de l'adsorption de protéines sur des supports d'agarose (gel à base de sucres utilisé en électrophorèse) à partir de résultats expérimentaux. Grâce à des protéines radioactives, les auteurs ont montré que la perte dépendait du nombre de molécules initialement présentes sur la surface et suivait une loi exponentielle.

II.52. Détermination du modèle

Nous avons observé deux types de comportement de désorption : un comportement de type exponentiel (cf. figure (II).17) et un comportement mixte (cf. figure (II).18).

Supposons que le départ des molécules de la surface soit fonction de la quantité de molécules Q_s restantes sur la surface à l'instant t , nous pouvons alors écrire :

$$\frac{dQ_s}{dt} = -k_1 Q_s \quad k_1, \text{ constante de vitesse (cinétique du premier ordre)}$$

soit :

$$\frac{dQ_s}{Q_s} = -k_1 dt$$

$$\ln \frac{Q_s}{q} = -k_1 t \quad q, \text{ constante}$$

$$Q_s = q \exp(-k_1 t)$$

Si Q_{s_0} est la quantité de molécules adsorbées sur la surface au temps t_0 , début de la désorption, alors :

$$\frac{Q_s}{Q_{s_0}} = \exp(-k_1(t - t_0))$$

De même, si $Q_{dés}$ la quantité de molécules désorbées à l'instant t , nous pouvons écrire :

$$Q_{dés} = Q_{s_0} - Q_s$$

$$\text{soit : } Q_{dés} = Q_{s_0} \left(1 - \frac{Q_s}{Q_{s_0}}\right)$$

et :

$$\boxed{Q_{dés} = Q_{s_0} \left(1 - \exp[-k_1(t - t_0)]\right)}$$

Cette équation correspond à la forme exponentielle des courbes de désorption (cf. figures (II).17 et 18).

Si nous supposons à présent que le départ des molécules de la surface est indépendant de la quantité de molécules à l'instant t , ce qui veut aussi dire que les molécules ont une probabilité identique d'être désorbées quel que soit le site où elles se trouvent, alors nous pouvons écrire :

$$\frac{dQ_s}{dt} = -k_0 \quad k_0, \text{ constante de vitesse (cinétique d'ordre 0)}$$

soit :

$$Q_s = -k_0 t + Cste$$

et si Q_{s_0} est la quantité de molécules adsorbées sur la surface au temps t_0 :

$$Q_{s_0} = -k_0 t_0 + Cste$$

Alors :

$$Q_s - Q_{s_0} = -k_0(t - t_0)$$

et donc puisque $Q_{dés} = Q_{s_0} - Q_s$:

$$\boxed{Q_{dés} = k_0(t - t_0)}$$

Cette équation correspond cette fois à une droite.

II.53. Résultats et conclusions

II.531. Résultats

Nous avons donc calculé pour chaque plaque étudiée les valeurs des constantes k_0 , k_1 , t_0 , et $C_{dés}$ à l'aide de régressions linéaire ou exponentielle.

Nous avons classé les résultats en deux parties : les plaques dont la désorption suivait une cinétique du premier ordre (comportement exponentiel), et celles qui suivent d'abord une cinétique d'ordre zéro puis une cinétique d'ordre 1 (comportement mixte).

a) Cinétique du premier ordre

Tableau (II).5.
Valeurs du coefficient k_1 pour chaque plaque et chaque type de silanisation
Comportement purement exponentiel.

Plaque	$C_{dés}$ ($\mu\text{mol}/\text{m}^2$)	Type de surface	Type de silanisation	k_1 (jour^{-1})
102	9,56	s	e	0,090
12	1,41	v	e	0,225
104	15,35	s	a	0,202
203	4,58	s	a	0,427
10	2,99	v	a	0,250
45	2,52	v	ha	0,282
219	2,02	s	c1a	0,211
204	0,85	v	c1a	0,204
217	13,34	s	c2e	0,045

b) Cinétiques d'ordres zéro et un

Tableau (II).6.
Valeurs des coefficients k_0 , t_0 et k_1 pour chaque plaque et chaque type de silanisation
Comportement mixte.

Plaque	$C_{dés}$ ($\mu\text{mol}/\text{m}^2$)	Type de surface	Type de silanisation	k_0 (jour^{-1})	t_0 (jour)	k_1 (jour^{-1})
41	32,57	v	e	$6,39 \cdot 10^{-10}$	17	0,210
101	421,22	s	e	$9,81 \cdot 10^{-10}$	21	0,487
44	51,77	v	a	$4,64 \cdot 10^{-10}$	18	0,167
103	48,07	s	hc	$5,31 \cdot 10^{-10}$	19	0,219
43	31,89	v	he	$7,87 \cdot 10^{-10}$	11	0,169
202	56,52	v	hc	$4,95 \cdot 10^{-10}$	26	0,273
105	29,26	s	ha	$5,88 \cdot 10^{-10}$	18	0,178
113	146,30	s	ha	$18,82 \cdot 10^{-10}$	29	0,137
114	418,81	s	ha	$25,33 \cdot 10^{-10}$	29	0,177
4	2,26	s	c ₁ a	$0,61 \cdot 10^{-10}$	4	0,474
216	17,12	s	c ₂ e	$1,35 \cdot 10^{-10}$	35	0,124

II.532. Conclusions

L'analyse de ces tableaux permet de compléter l'étude sur la modification de la surface et plus particulièrement le phénomène de désorption. En effet, dans le paragraphe précédent, seules les quantités désorbées totales étaient prises en considération.

Premièrement, nous pouvons constater qu'il existe un lien entre le type de silanisation et le comportement lors de la désorption. En effet, d'une part, il semble que les surfaces silanisées suivant les types a, e ou avec un catalyseur présentent en majorité une cinétique de désorption d'ordre 1 (cf. tableau (II).5). D'autre part, les surfaces ayant été silanisées selon une polymérisation horizontale suivent d'abord une cinétique d'ordre zéro et ensuite une cinétique d'ordre 1 (tableau (II).6).

Deuxièmement, en comparant les valeurs des concentrations désorbées dans le cas des deux tableaux ((II).5 et (II).6) nous avons constaté que les valeurs de $C_{dés}$ dans le cas d'une cinétique d'ordre 1 étaient jusqu'à 100 fois plus petites que celle observées dans le cas d'une cinétique mixte. Ensuite, les valeurs des constantes k_1 sont du même ordre de grandeur pour toutes les plaques ce qui laisse à penser que le phénomène de désorption est identique pour la partie exponentielle. C'est pourquoi, nous avons supposé que dans le cas d'une cinétique mixte, la grande valeur de $C_{dés}$ correspondait à un dépôt de

plusieurs couches. Ainsi, pouvons-nous peut-être expliquer la partie linéaire des courbes qui correspondrait à la désorption des couches supérieures. Et ainsi, puisque la valeur de $C_{dés}$ est grande par rapport à celle obtenue à la fin de la partie linéaire, nous aurions modélisé par une droite ce qui pourrait être une exponentielle.

Cependant, nous ne pouvons pas l'affirmer car :

- les molécules de ces couches devraient avoir une vitesse de désorption (donc une pente de la courbe) plus grande que les molécules de la première couche fixée à la surface ; en effet, les forces intervenant dans la liaison molécule-surface sont plus fortes que celles intervenant dans la liaison molécule-molécule. Or la constante de vitesse k_0 est plus faible que k_1 ,
- la quantité désorbée appartenant à la toute première couche (dont la vitesse de désorption suit une loi exponentielle) devrait être du même ordre de grandeur pour toutes les plaques ; or dans le cas où il y a une première cinétique, elle est nettement plus faible (jusqu'à 100 fois plus faible).

Nous avons représenté sur les figures (II).19 et (II).20, les états de surfaces après chaque type de silanisation.

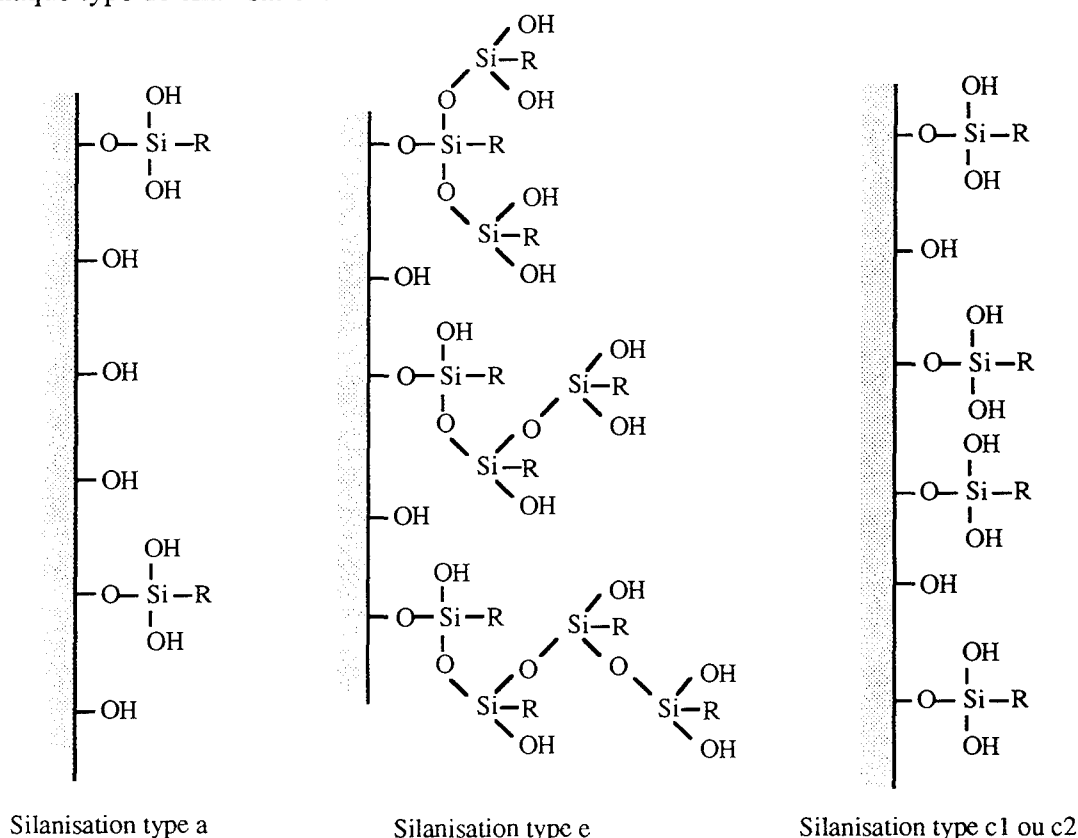
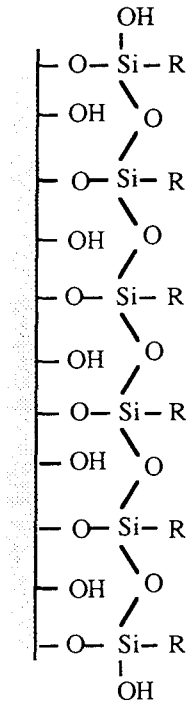


Figure (II).19.
Etat de la surface après des silanisations entraînant une loi de désorption purement exponentielle.

Ce qui semble paradoxal, c'est que les constantes de vitesses de la désorption des molécules adsorbées sur des surfaces du type de celles de la figure (II).19 sont du même ordre de grandeur (environ 0,250 - cf. tableau (II).5) alors que l'état de la surface est différent. Par ailleurs, les constantes liées aux états de surfaces représentés sur la figure (II).20, sont plus dispersées autour de la valeur moyenne (cf. tableau (II).6) alors que ces types de modification entraînent des surfaces homogènes.



Silanisation type h

Figure (II).20.
Etat de la surface après des silanisations entraînant une loi de désorption mixte.

II.6. ETUDE DE LA STABILITE DU GREFFAGE DANS L'EAU

II.61. Objectif

L'objectif de cette étude qui consiste à tester la stabilité du greffage dans l'eau, est relatif à terme, à la mise en place de la surface greffée dans un écoulement.

La couverture de la surface doit être stable pour ne pas influencer la réponse du capteur. Ainsi, le risque de diminution de la fluorescence due à la perte de molécules dans l'eau doit-il être écarté ou quantifié.

Dans un premier temps, nous avons choisi de séparer le traitement sous l'eau et l'analyse fluorimétrique. Ces expériences en discontinu nous ont apporté des résultats non seulement sur la stabilité, mais aussi sur l'homogénéité du greffage.

Dans une deuxième approche, nous avons choisi d'effectuer l'analyse fluorimétrique pendant l'écoulement de l'eau (en continu) pour essayer d'observer et de quantifier les changements. Deux méthodes ont été suivies : la première est une analyse de la fluorescence de l'eau en contact avec la surface et la deuxième est une analyse directe de la fluorescence sur la surface.

II.62. Stabilité dans l'eau en absence d'écoulement

De nombreux auteurs (§ I.313.a1) font état d'une hydrolyse et donc d'une dégradation de la couverture de surface par suite de séjours prolongés dans l'eau. L'étude réalisée ici permet de confirmer ce phénomène dans le cas d'une surface défavorable, comme celle obtenue après un greffage selon une silanisation de type anhydre. Ainsi, les liaisons hydrolysables sont-elles plus accessibles.

Nous avons donc choisi de greffer une plaque dans les conditions retenues et d'analyser l'eau dans laquelle cette plaque a séjourné.

II.621. Conditions expérimentales et mode opératoire

a) Greffage

Une plaque en silice numérotée 5, a été silanisée suivant les conditions du mode a (couverture de type monocouche), puis a subi un traitement de désorption au DMF.

b) Analyse

Afin de maintenir la plaque dans la cuve contenant l'eau, le système décrit sur la figure (II).21 a été fabriqué. La hauteur de la plaque dans la cuve est réglable par l'utilisation d'une vis.

La plaque est laissée dans 3 mL d'eau déminéralisée pendant quelques jours. Ensuite, l'eau est analysée par fluorimétrie. Lors de cette analyse, la longueur d'onde d'excitation est fixée à 337 nm et l'émission de fluorescence est récupérée à angle droit à 376 nm. Ensuite, la plaque est replongée dans un nouveau volume de 3 mL d'eau pour un nouveau séjour.

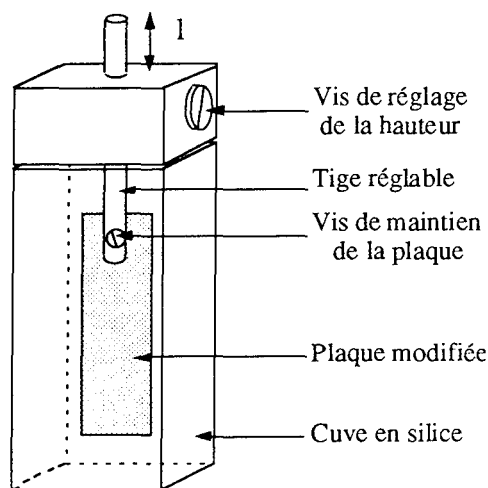


Figure (II).21.
Système de maintien de la plaque pendant son séjour dans l'eau.

II.622. Résultats

Les résultats (tableau (II).7 et figure (II).22) correspondent aux quantités d'APB dans l'eau après séjour de la plaque calculées grâce à la courbe étalon (cf. annexe III).

L'APB étant, d'une part, très peu soluble dans l'eau et, d'autre part, la surface ayant subi un traitement de désorption au DMF, nous pouvons émettre l'hypothèse que la désorption de molécules est faible, voire nulle dans ce milieu. Ainsi, les quantités présentes dans l'eau seront-elles dues à l'hydrolyse de la liaison surface-fluorophore.

Forte au début, l'hydrolyse s'atténue au cours du temps.

Tableau (II).7.
Quantités d'APB présentes dans l'eau
où a séjourné une plaque silanisée a (plaque 5).

Jour	Intensité à 376 nm (10 ⁵ cps)	Concentration (μmol/L)
3	42,712	6,01
4	20,486	2,61
6	34,265	4,68
7	14,291	1,74
8	16,185	2,00
9	13,340	1,61
12	15,147	1,86
14	21,378	2,74
19	15,980	1,97
21	6,2375	0,68
30	2,8554	0,28

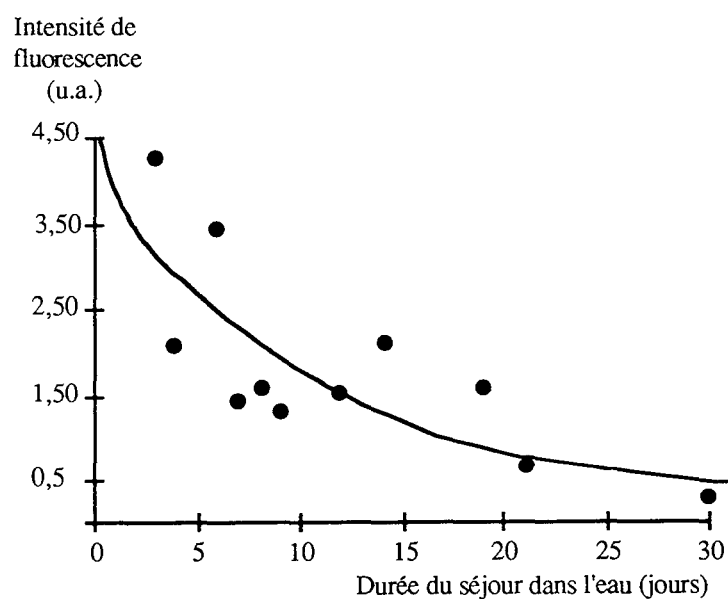


Figure (II).22.
Intensité de fluorescence à 376 nm
de l'eau où a séjourné la plaque silanisée a (plaque 5).

II.63. Analyse en discontinu

Cette analyse mesure l'intensité de fluorescence des molécules sur la surface après action d'un courant d'eau. Il est alors primordial de toujours exciter la plaque au même endroit. Le but premier est de déterminer la stabilité de la couverture de la surface sous un courant d'eau (aucune ou faible diminution de l'intensité de fluorescence). Nous avons donc choisi de tester plusieurs types de surface provenant de divers modes de silanisation, déjà étudiés de manière qualitative et quantitative. Au cours de cette étude, nous avons pu montrer que les résultats conduisaient aussi à des renseignements sur l'homogénéité du greffage.

II.631. Conditions expérimentales et mode opératoire

Les différents modes de silanisation testés sont récapitulés dans le tableau (II).8.

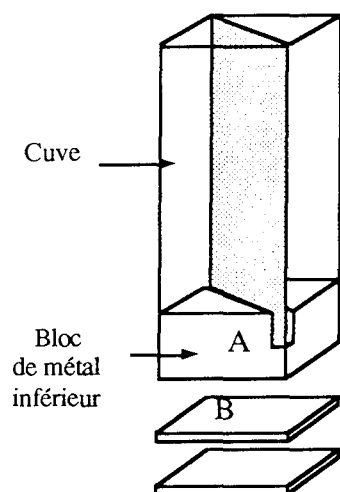


Figure (II).23.
Système de maintien de la plaque
pour l'analyse de l'action d'un
courant d'eau.

L'analyse fluorimétrique devant s'effectuer de manière reproductible après chaque passage sous l'eau, le système de maintien de la plaque dans la cuve décrit sur la figure (II).23 a été mis au point : deux blocs de métal, fendus en diagonale (A), permettent de tenir la plaque en haut et en bas de la cuve.

Afin d'examiner plusieurs positions sur la surface, une série de petites plaquettes en Téflon (B), aux dimensions de la base de la cuve (1 cm x 1 cm) et épaisses de 1 mm peuvent surélever l'ensemble sans bouger la plaque dans la cavité du SPEX, permettant ainsi l'analyse suivant une ligne verticale.

Chaque plaque subit le traitement suivant après l'étape de greffage : elle est mise dans un tube en verre relié directement à l'arrivée d'eau froide. Le débit est réglé et identique pour chacune. La plaque reste sous le courant d'eau pendant 10 min avant d'être placée dans le système de maintien pour une analyse par fluorimétrie. L'intensité de fluorescence est mesurée sans plaquette (niveau noté 0) puis en ajoutant successivement les plaquettes deux par deux pour balayer la surface suivant une ligne verticale (niveau 2, 4, 6 et enfin 8). Nous obtenons donc les intensités de fluorescence pour chaque plaque sur cinq niveaux.

Tableau (II).8.
Récapitulatif des conditions expérimentales de greffage des plaques
avant l'étude de la stabilité sous un courant d'eau.

	Plaque 16	Plaque 17	Plaque 19	Plaque 21
Type de surface	s	s	s	s
Type de silanisation	e	ha	c1a	a

II.632. Résultats

Les résultats sont donnés sous forme de tableaux (tableaux (II).9 à (II).12) reliant l'intensité de fluorescence mesurée sur la plaque (chiffres bruts donnés par le spectrofluorimètre SPEX) après chaque traitement sous l'eau. L'instant $t = 0$ correspond à la première mesure réalisée sur la plaque (avant tout passage sous l'eau).

Nous avons ensuite tracé les courbes (figures (II).24 à (II).27) liant l'intensité de fluorescence en fonction du traitement. Rappelons qu'il n'est pas possible pour une mesure de fluorescence sur la surface (APB greffé) de la corrélérer à une concentration d'APB libre dans l'eau (§ II.331.a). La pente moyenne α , représentant la perte globale de l'intensité de fluorescence en u.a./min, est indiquée pour chaque graphe.

Tableau (II).9.
Intensité de fluorescence des différents niveaux pour une silanisation e (plaque 16).

Durée du traitement sous l'eau (min)	Niveaux (intensité en 10^5 cps)				
	0	2	4	6	8
0	4,1930	4,1156	3,9689	3,6168	3,4691
10	3,1475	3,1550	2,9824	2,8085	2,6602
20	4,3395	4,7473	4,9148	4,7039	4,2741
30	2,7832	2,8731	2,6896	2,6474	2,4569
40	3,6065	3,4767	3,1406	2,6044	2,3342
50	4,4965	4,6787	4,7706	4,7449	4,7101
60	2,8631	2,6826	2,6931	2,3940	2,3021
70	1,3894	1,6757	1,2589	1,3291	1,2214
80	2,1111	2,1488	2,2456	2,4572	2,3595
90	1,0226	1,0717	1,0872	1,1034	1,1638

Tableau (II).10.

Intensité de fluorescence des différents niveaux pour une silanisation ha (plaque 17).

Durée du traitement sous l'eau (min)	Niveaux (intensité en 10^5 cps)				
	0	2	4	6	8
0	5,2945	5,9766	5,3978	4,5948	4,7889
10	5,3292	6,0814	6,1079	5,4545	5,2639
20	5,1533	5,9575	6,0563	5,3329	5,1197
30	4,8548	5,6871	5,5617	4,8560	4,6555
40	3,2925	3,2753	3,3137	3,2649	2,6852
50	3,3690	3,7633	3,5138	2,9449	2,4609
60	4,4692	4,7151	4,6626	4,4425	3,6786
70	5,2718	6,1828	6,2686	5,6874	5,3986
80	5,5310	6,5248	6,6713	6,0272	5,6637
90	4,0022	4,4825	4,0107	3,5927	3,0082

Tableau (II).11.

Intensité de fluorescence des différents niveaux pour une silanisation c₁a (plaque 19).

Durée du traitement sous l'eau (min)	Niveaux (intensité en 10^5 cps)				
	0	2	4	6	8
0	4,6449	5,0468	5,3596	5,7876	6,3033
10	4,3950	4,4922	4,2471	3,9305	3,6347
20	5,4359	5,8770	5,8501	6,1799	6,4696
30	2,9496	3,0035	2,9851	2,6309	2,4137
40	4,6232	4,9852	4,9411	4,7394	4,5520
50	3,3072	3,0608	2,7965	2,1328	1,8217
60	3,9852	4,1348	4,2182	3,9391	3,5358
70	4,1354	4,2899	4,2277	4,0428	3,8736
80	3,1712	3,0805	2,8469	2,4037	2,0033
90	2,7672	2,8934	2,8492	2,7485	2,4499

Tableau (II).12.

Intensité de fluorescence des différents niveaux pour une silanisation a (plaque 21).

Durée du traitement sous l'eau (min)	Niveaux (intensité en 10^5 cps)				
	0	2	4	6	8
0	5,5355	5,6974	6,0452	5,0748	3,7484
10	10,353	9,0732	12,159	10,043	6,6207
20	7,8875	7,4694	8,9283	6,5588	4,0997
30	4,3891	4,5869	4,3249	3,2386	2,2825
40	10,244	9,3650	11,570	9,6500	6,3777
50	5,3215	5,1830	6,9448	6,0209	4,0010
60	2,8040	2,8366	2,5807	1,9767	1,3460
70	8,6556	7,0751	8,2264	6,3377	3,9480
80	4,4817	4,2580	3,6002	2,4283	1,5139
90	2,8917	2,2790	2,4482	1,8967	1,2397

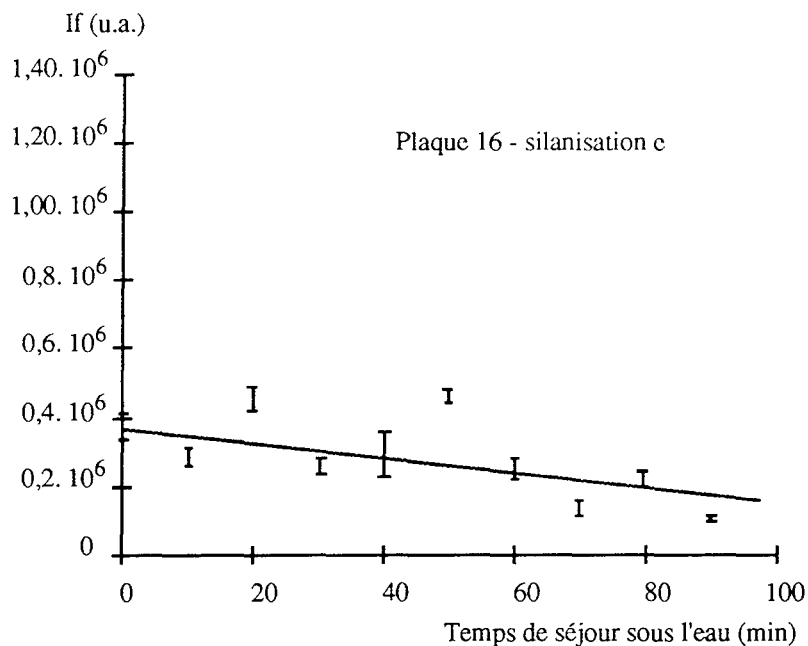


Figure (II).24.

Intensité de fluorescence à 376 nm mesurée sur la plaque 16 pour les 5 niveaux après chaque traitement sous l'eau
 $\alpha = - 2320 \text{ u.a./min.}$

Les barres verticales correspondent aux intensités minimales et maximales obtenues pour chaque série de mesure et leurs hauteurs sont liées à la dispersion des valeurs.

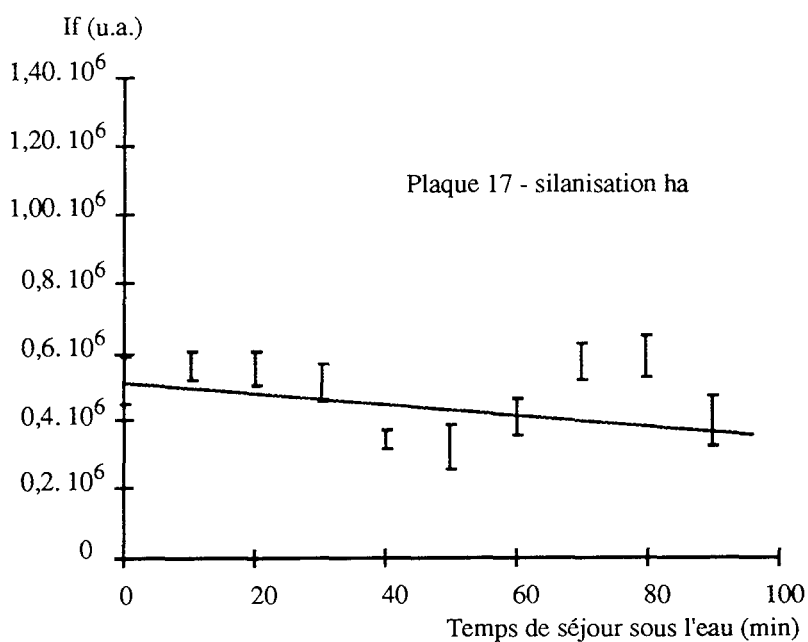


Figure (II).25.

Intensité de fluorescence à 376 nm mesurée sur la plaque 17 pour les 5 niveaux après chaque traitement sous l'eau
 $\alpha = - 740 \text{ u.a./min.}$

Les barres verticales correspondent aux intensités minimales et maximales obtenues pour chaque série de mesure et leurs hauteurs sont liées à la dispersion des valeurs.

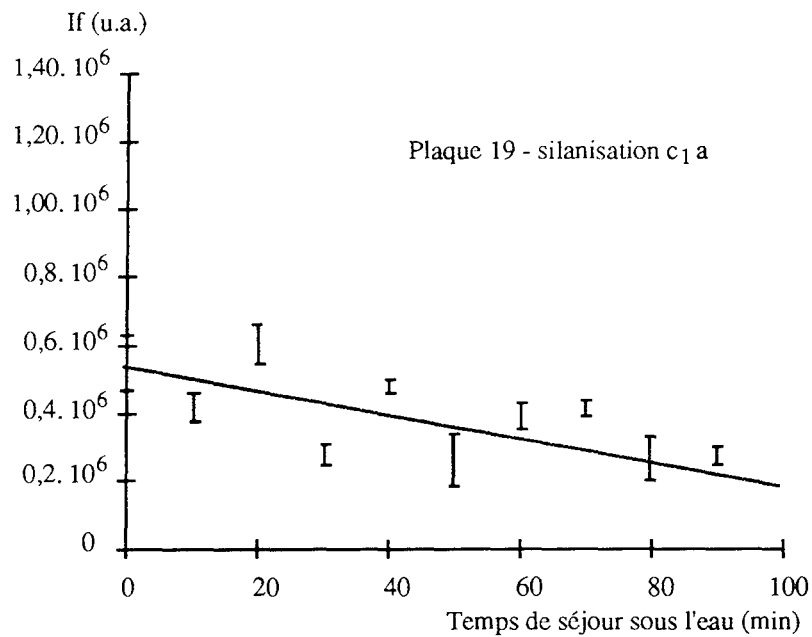


Figure (II).26.

Intensité de fluorescence à 376 nm mesurée sur la plaque 19
pour les 5 niveaux après chaque traitement sous l'eau
 $\alpha = - 3680$ u.a./min.

Les barres verticales correspondent aux intensités minimales
et maximales obtenues pour chaque série de mesure
et leurs hauteurs sont liées à la dispersion des valeurs.

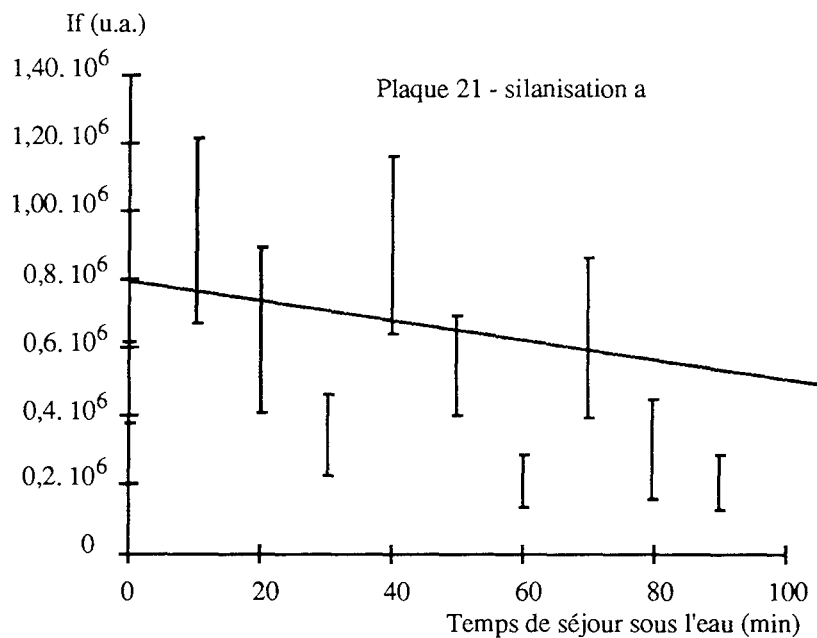


Figure (II).27.

Intensité de fluorescence à 376 nm mesurée sur la plaque 21
pour les 5 niveaux après chaque traitement sous l'eau
 $\alpha = - 6740$ u.a./min.

Les barres verticales correspondent aux intensités minimales
et maximales obtenues pour chaque série de mesure
et leurs hauteurs sont liées à la dispersion des valeurs.

II.633. Discussion

Les renseignements fournis par ces graphiques sont de deux types. Le premier concerne l'homogénéité du greffage qui se traduit par une dispersion des mesures pour un même traitement le long des 5 positions (analyse en ligne verticale sur la plaque). Le deuxième est la stabilité du greffage par suite d'un écoulement d'eau. Il se traduit par une diminution globale des intensités de fluorescence.

Ainsi, en ce qui concerne l'homogénéité du greffage, nous retrouvons ce que nous avons déjà vu, à savoir qu'une silanisation par polymérisation horizontale conduit à une faible dispersion des intensités de fluorescence de l'APB greffé (jusqu'à $0,2 \cdot 10^6$), alors qu'une silanisation en milieu anhydre produit une surface non totalement recouverte et donc à une inhomogénéité du greffage visible par les très fortes dispersions des valeurs de l'intensité (entre $0,6 \cdot 10^6$ et $1,20 \cdot 10^6$ pour le traitement à $t = 1$ par exemple).

Les droites tracées sur les graphiques correspondent à la perte globale de l'intensité de fluorescence due à l'action de l'eau. Les valeurs des pentes, α , sont exprimées pour chaque graphe en u.a./min. Il apparaît clairement que la polymérisation horizontale est, ici encore le meilleur moyen d'obtenir une surface stable. La pente de la droite (740) est nettement inférieure aux trois autres (2320, 3680 et 6740).

Il ressort donc de cette première étude qu'une silanisation par polymérisation horizontale est la manière la plus judicieuse de greffage.

Cependant il est à noter que le fait d'enlever la plaque de son support pour la mettre sous un courant d'eau peut conduire à des erreurs lors de la remise en place de la plaque. En effet, il n'est pas impossible de changer la position de la plaque entre chaque traitement dans son système de maintien. Alors, dans un tel cas, si le greffage est inhomogène, la partie excitée ne sera plus tout à fait la même et donc *a fortiori* la réponse sera différente. C'est ce qui se passe pour la plaque 21 dont la couverture inhomogène est responsable de différences très nettes dans les intensités de fluorescence. Pour s'affranchir de ceci, nous avons décidé d'utiliser une configuration de surface différente (§ II.642.), à savoir un tube au travers duquel l'eau circulera et qui sera maintenu rigidement dans la cavité du SPEX.

II.64. Analyse en continu

Cette analyse permet d'obtenir directement une réponse de la surface excitée pendant l'écoulement de l'eau. Deux types de tests ont été conduits : ils sont fondés sur l'étude de la fluorescence de deux entités différentes. La première repose sur la possibilité de présence de molécules fluorescentes par désorption dans l'eau d'écoulement. Ainsi, allons-nous étudier, dans un premier temps, la réponse à une excitation à 337 nm de l'eau. La deuxième est, quant à elle, beaucoup plus proche de la configuration finale puisque nous allons mesurer directement la réponse sur la surface pendant l'écoulement.

II.641. Analyse de l'eau d'écoulement

Puisque le traitement par le DMF désorbe les molécules faiblement liées sur la surface, nous avons décidé, en plus de l'étude de la fluorescence de l'eau après écoulement, de tester deux plaques, greffées de façon identique mais dont l'une a subi un post-traitement de désorption. Ceci, afin de pouvoir contrôler l'efficacité d'un traitement au DMF pour une surface destinée à être utilisée sous l'eau. Enfin, pour nous permettre de déceler la moindre réponse à l'excitation, nous avons enlevé la majorité de l'oxygène dans l'eau pour diminuer l'inhibition.

a) Conditions expérimentales et mode opératoire

a1) Greffage

Deux plaques en silice pure ont été utilisées. La première (numérotée 121) est silanisée suivant le mode ha. Elle est ensuite lavée dans du toluène.

La seconde (numérotée 122) subit ensuite un traitement au DMF pendant 30 jours.

a2) Analyse

Chacune des plaques est immergée dans un récipient contenant 500 mL d'eau déminéralisée agitée. Une pompe péristaltique permet de faire circuler l'eau à travers la cellule d'analyse du SPEX (figure (II).28). Cette eau a été dégazée par un fort bullage d'azote pendant 1 h.

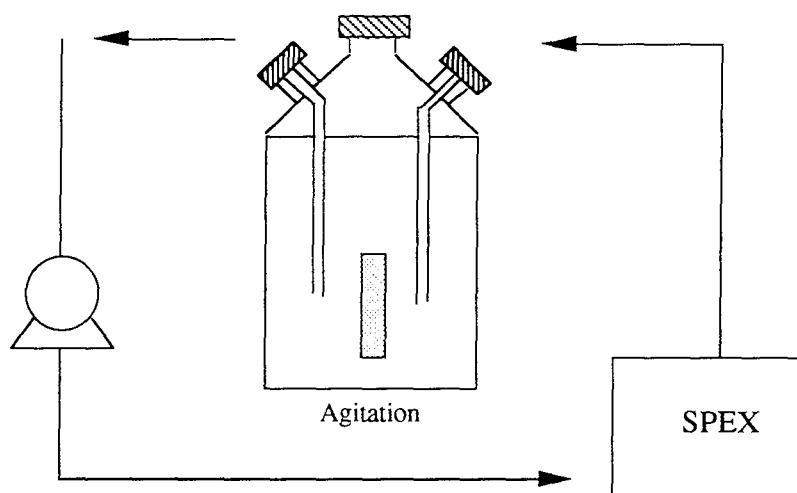


Figure (II).28.
Circulation de l'eau pour l'analyse en continu.

L'analyse est réalisée pour une excitation à 337 nm et l'émission de fluorescence à 376 nm est enregistrée sur une base de temps de 500 min (soit 30 000 s) pour la plaque 121 et de 400 min (soit 24 000 s) pour la plaque 122.

b) Résultats

Les résultats bruts sont les enregistrements dans le temps obtenus par excitation à 337 nm et émission à 376 nm lors de l'analyse.

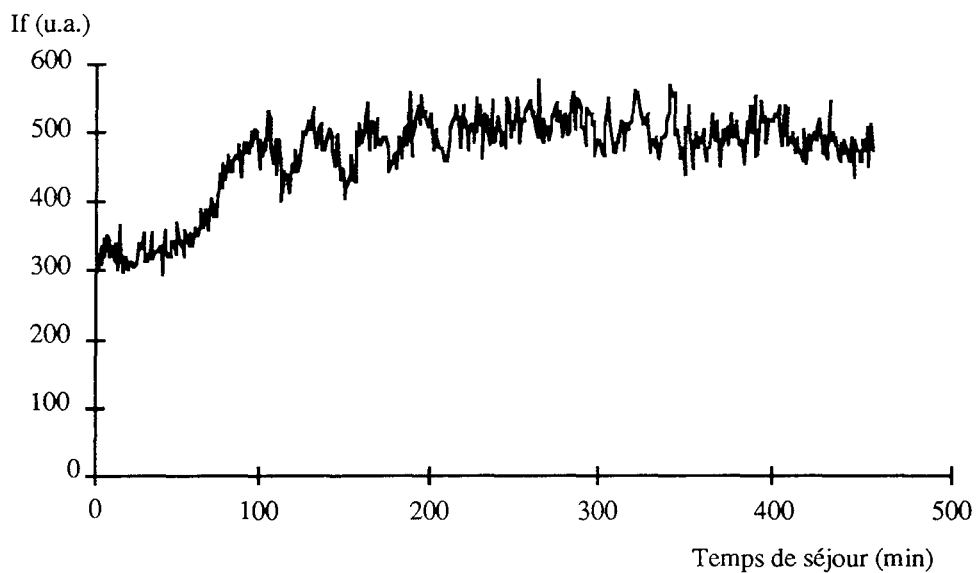


Figure (II).29.
Emission de fluorescence à 376 nm de l'eau pendant le séjour de la plaque 121.

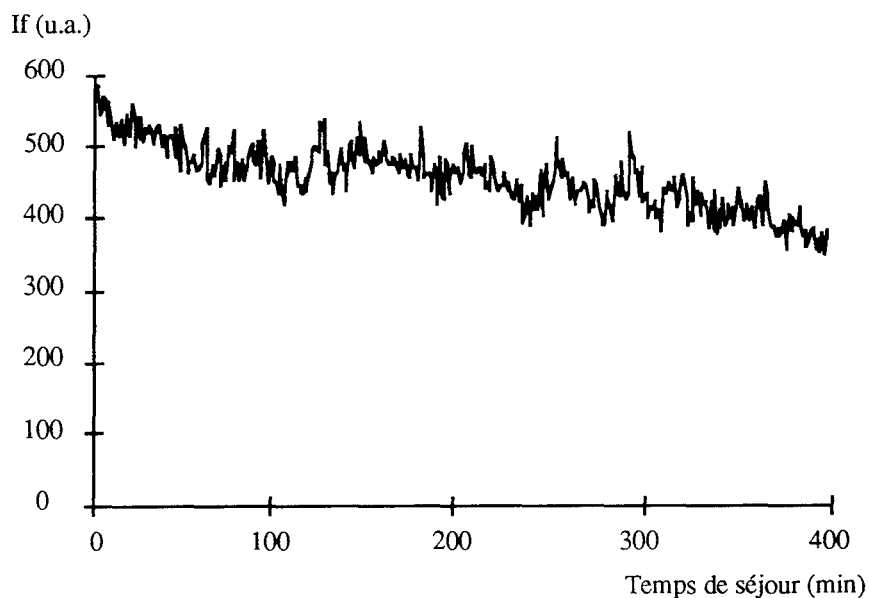


Figure (II).30.
Emission de fluorescence à 376 nm de l'eau pendant le séjour de la plaque 122.

c) Discussion

Le passage du fluorophore de la surface vers l'eau entraîne une augmentation de l'intensité de fluorescence. C'est ce que nous observons dans le cas de la figure (II).29 où l'intensité de fluorescence augmente très rapidement au départ pour la plaque 121 qui n'a pas été traitée par le DMF.

La différence de traitement entre les plaques 121 et 122 apparaît sur la figure (II).30 Nous n'observons pas d'augmentation de la fluorescence et au contraire l'intensité diminue. D'une part, le traitement au DMF est efficace car les molécules faiblement liées ne se désorbent plus dans l'eau. D'autre part, nous pouvons observer une diminution de la fluorescence. Cet effet peut être expliqué par la réoxygénation de l'eau pendant le test. En effet, le récipient ne fermant pas hermétiquement, l'eau s'est réoxygénée par un apport de l'extérieur, augmentant ainsi la concentration en gaz dissout et diminuant la fluorescence par effet inhibiteur.

Cependant, ces conditions d'étude ne donnent des indications que sur la perte dans l'eau et ne nous permettent aucune conclusion quant à ce qui se passe réellement sur la plaque. C'est pourquoi, nous avons envisagé une deuxième étude dans laquelle l'analyse se fera directement sur la surface.

II.642. Analyse de la surface pendant l'écoulement

Dans ce dernier cas, l'analyse de la fluorescence est directement effectuée sur la surface et nous mesurons donc la réponse des molécules greffées au contact direct de l'eau en écoulement. Cette méthode d'analyse nous rapproche du capteur dans les conditions finales d'utilisation.

Pour ce faire, nous avons choisi de greffer l'intérieur de tubes en silice pure par les mêmes méthodes que celles utilisées pour les plaques. La circulation d'eau est alors réalisée à l'intérieur de ces tubes qui sont eux-mêmes positionnés dans le SPEX. Afin de nous assurer que le choix d'une silanisation selon le type ha était le meilleur moyen par rapport à une silanisation selon le type c_{1a}, nous avons greffé et étudié deux tubes en parallèle.

a) Conditions expérimentales et mode opératoire

a₁) Greffage

Les tubes utilisés sont greffés suivant les types ha et c_{1a}. L'extérieur de chaque tube est ensuite nettoyé avec précaution en utilisant de la soude 1 M afin que les molécules d'APB greffées sur cette face aient le moins d'influence possible.

a₂) Montage expérimental

Un rotamètre à bille (Emerson Electric réf. PE 1704) est utilisé pour mesurer le débit d'eau. Il est relié directement à l'arrivée d'eau (robinet) et au tube greffé, lui-même relié

au récipient d'évacuation de l'eau. La valeur du débit peut varier de 4 à 40 L/h. Le tube est maintenu rigide dans la cavité du SPEX pour éviter tout décalage dans les mesures de l'intensité de fluorescence.

a3) Mode opératoire

Le débit est réglé à son maximum. Les enregistrements dans le temps sont réalisés en excitant à 337 nm et en mesurant l'émission de fluorescence à 376 nm. L'analyse s'effectue toutes les 5 secondes sur une base de temps de 2400 s pour le tube silanisé c1a et de 1500 s pour le tube silanisé ha. La durée de l'écoulement est variable suivant le type de tube.

b) Résultats

Les résultats sont présentés sur les figures (II).31 et (II).32 donnant l'intensité de fluorescence du tube à 376 nm en fonction du temps pour une excitation à 337 nm.

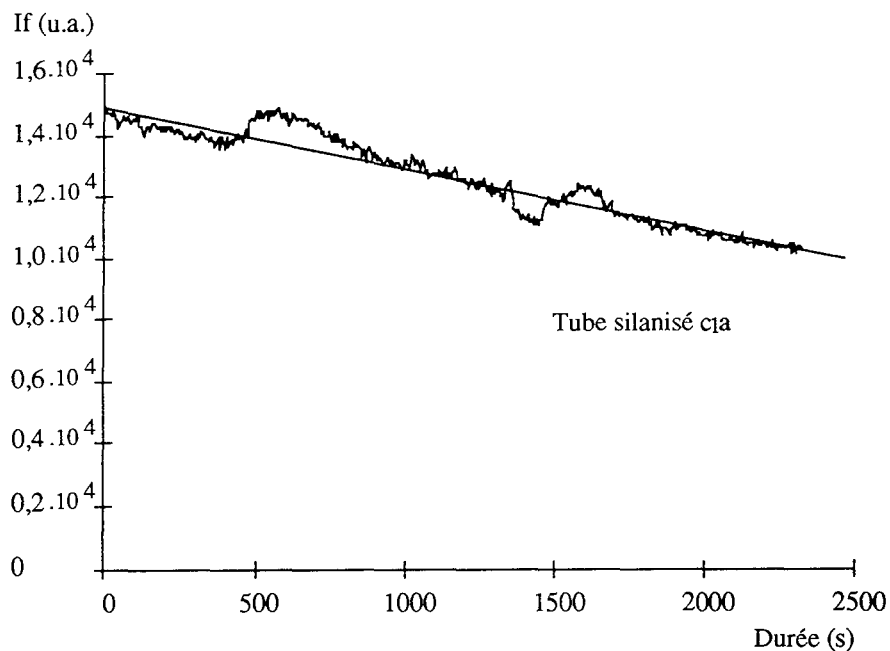


Figure (II).31.
Intensité de fluorescence du tube à 376 nm pour une excitation à 337 nm
pendant l'écoulement de l'eau à vitesse maximale
pour une durée totale de 2400 s
(une analyse toutes les 5 s).

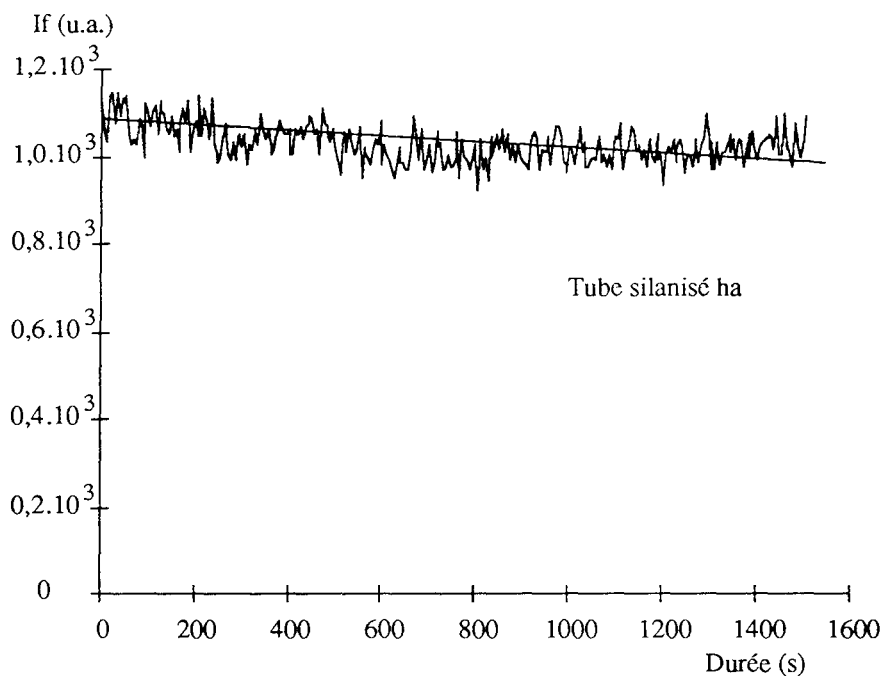


Figure (II).32.
Intensité de fluorescence du tube à 376 nm pour une excitation à 337 nm
pendant l'écoulement de l'eau à vitesse maximale
pour une durée totale de 1500 s
(une analyse toutes les 5 s).

c) Conclusion

Il apparaît clairement, en confrontant les deux graphes qu'une silanisation de type ha est préférable. En effet, dans le cas du tube silanisé en présence de catalyseur, nous observons une perte d'environ 30 % de l'intensité de fluorescence au bout des 2400 s. Même en ramenant le temps à 1500 s (pour comparer avec le tube silanisé ha), la perte est de 20 %. Ce qui conforte notre opinion : le meilleur moyen d'obtenir une surface stable dans les conditions d'utilisation ultérieure est de greffer la surface par une silanisation ha.

Notons par ailleurs qu'une silanisation de type ha conduit à des intensités de fluorescence plus faibles (facteur 10 par rapport à une silanisation c_1a).

Si nous observons les variations de l'intensité de fluorescence sur la figure (II).32 uniquement, nous pouvons conclure qu'un greffage de type ha permet d'obtenir une surface modifiée stable sous un courant d'eau.

II.7. CONCLUSION

En conclusion de ce chapitre, nous avons pu obtenir des informations en rapport avec notre objectif, à savoir :

- la mise en place d'une méthode d'immobilisation de l'APB sur une surface qui présentait la plus grande stabilité sous un courant d'eau,
- la qualité des surfaces obtenues,
- la détermination des quantités effectivement greffées.

Au cours de cette partie, nous avons testé plusieurs types de modification chimique de la surface fondés sur la possibilité de contrôler l'humidité pendant l'étape de silanisation, permettant ainsi un contrôle de l'état de la surface silanisée. Ceci nous a conduit à choisir le mode de **silanisation ha**, où le silane se lie parallèlement à la surface. Le greffage ainsi obtenu s'est révélé stable sous un courant d'eau.

Dans le même temps, nous avons pu visualiser par microscopie optique à champ proche l'état de la surface pour les différents modes de greffage étudiés.

CHAPITRE III

Mise en œuvre du capteur

III.1. OBJECTIF DE L'ETUDE

Les études réalisées dans le chapitre II nous ont permis d'une part, de déterminer une méthode de greffage stable sous un courant de liquide, à savoir la modification de la surface par l'intermédiaire d'une silanisation avec polymérisation horizontale du silane (cf. § I.311).

D'autre part, nous avons pu mesurer l'émission de fluorescence pendant l'écoulement de l'eau sur la surface (cf. § II.642).

A présent, afin de pouvoir utiliser le capteur dans son environnement final, il est nécessaire :

- i) de mettre au point le capteur,
- ii) de tester sa sensibilité vis-à-vis de la présence ou l'absence d'oxygène dans le milieu aqueux.

Ainsi, ce dernier chapitre sera-t-il divisé en trois parties :

- descriptif de la configuration finale du capteur,
- établissement de la droite d'étalonnage (droite de Stern-Volmer),
- sensibilité du capteur.

III.2. CONFIGURATION DU CAPTEUR

III.2.1. Schéma

La figure (III).1 décrit le schéma du montage utilisé dans la suite de notre étude.

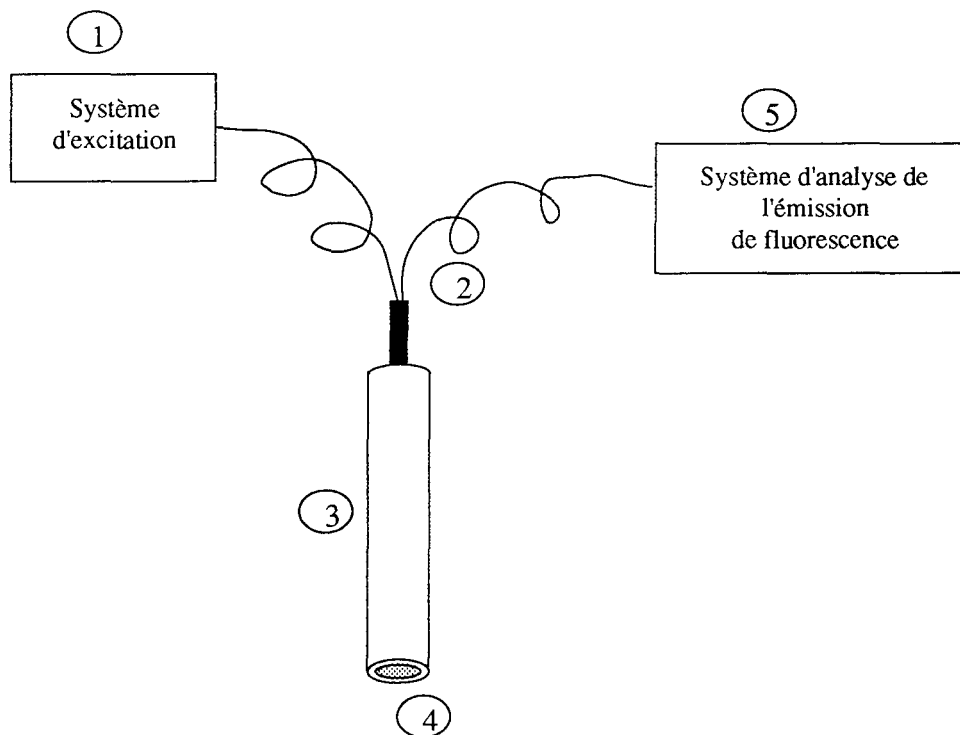


Figure (III).1.
Configuration finale du capteur.
2 : guide de lumière,
3 et 4 : corps du capteur.

III.22. Partie 1 : système d'excitation

Le système d'excitation est composé d'une source laser pulsé à azote. Le laser est de type VSL-337, Laser Science, Inc. Le tableau (III).1 donne ses caractéristiques.

Les dimensions du faisceau sont réduites par un diaphragme, puis la lumière est focalisée par une lentille U.V. sur l'entrée du système de guidage (figure (III).2). La fréquence des impulsions est positionnée à son maximum (20 Hz).

Tableau (III).1.
Caractéristiques du laser pulsé à azote.

Puissance maximale de sortie	2 mW
Durée des impulsions	3 ns
Energie	120 μ J
Fréquence	1 à 20 Hz
Longueur d'onde	337 nm
Dimensions du faisceau	3 mm x 8 mm

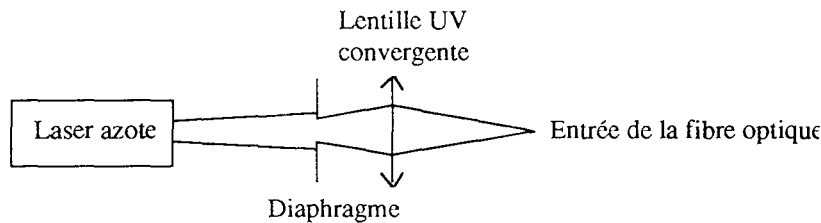


Figure (III).2.
Système d'excitation.
Focalisation de la lumière en sortie du laser sur l'extrémité de la fibre optique.

III.23. Partie 2 : guide de lumière

Le guide de lumière a été fabriqué sur demande par la société SEDI Fibres Optiques. Il se compose de sept fibres optiques insérées dans un montage spécifique (cf. figure (III).3).

III.231. Caractéristiques des fibres optiques

Les fibres optiques sont toutes équivalentes (référence HCG M0550T-10). Elles sont constituées d'un cœur de silice ($\varnothing = 550 \pm 12 \mu\text{m}$), d'un "cladding" de silice dopée ($\varnothing = 600 \pm 10 \mu\text{m}$), d'une gaine primaire de polymère ($\varnothing = 630 \pm 310 \mu\text{m}$) et d'une gaine secondaire de tefzel ($\varnothing = 750 \pm 30 \mu\text{m}$) (cf. figure (III).3).

La forte teneur en ions OH de la silice constituant le cœur de ces fibres permet une transmission laser U.V. et visible. L'ouverture numérique faible (0,22) impose une injection bien collimatée pour transmettre une puissance maximale. Cependant, il est à noter que ces fibres seront plus sensibles aux pertes de puissance par courbure que des fibres à grande ouverture numérique. L'atténuation de ces fibres est d'environ 200 dB/km pour une longueur d'onde de 340 nm et d'environ 60 dB/km pour une longueur d'onde de 380 nm. Il est donc nécessaire d'optimiser la longueur des fibres optiques pour avoir une perte très faible. Chaque fibre mesure 1,50 m. Dans la partie où les sept fibres sont réunies, une colle et une gaine spéciales ont été utilisées (colle non fluorescente et gaine imperméable aux rayonnements extérieurs).

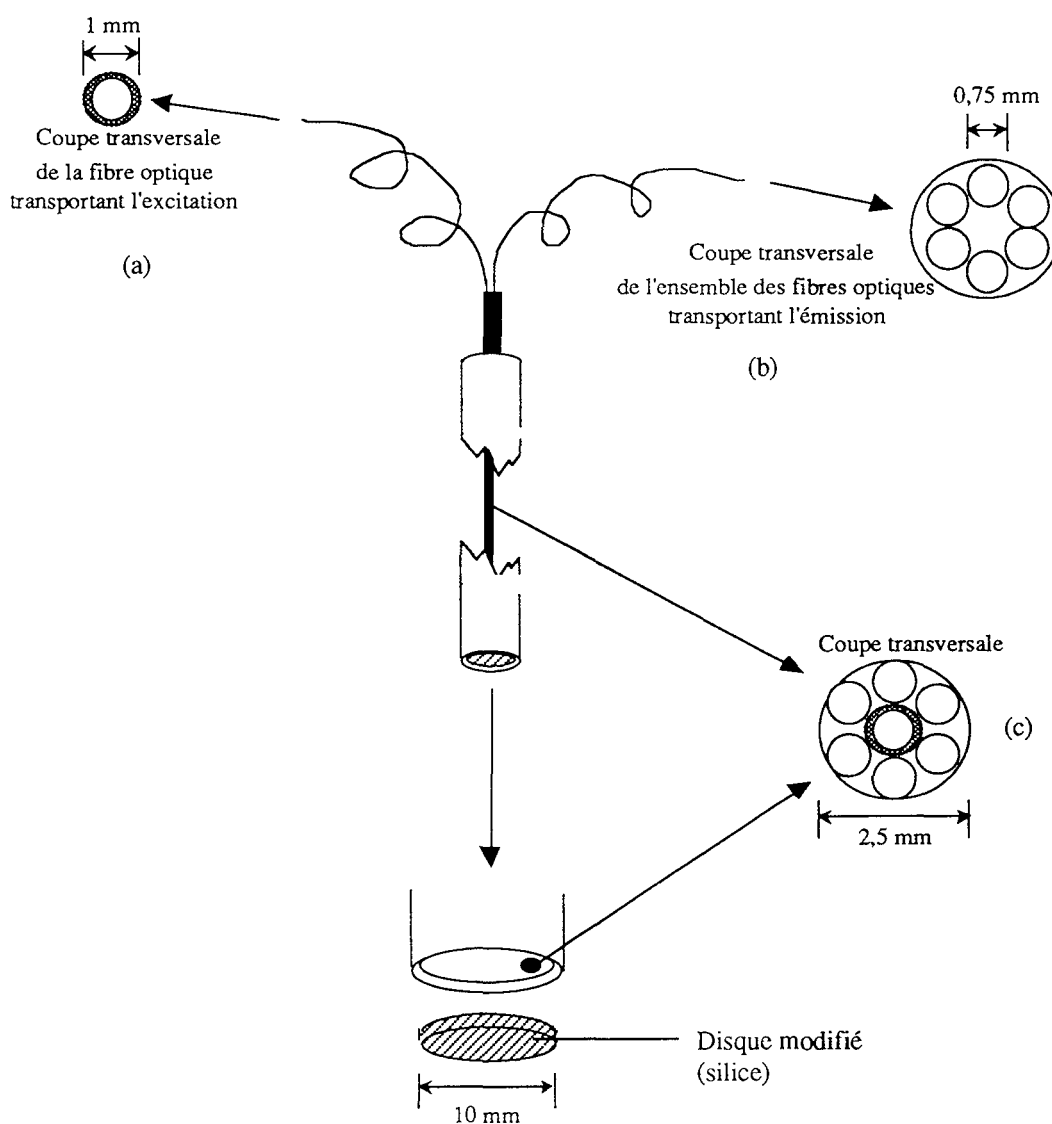


Figure (III).3.
Système de guidage de la lumière par fibres optiques.

III.232. Raccordements aux parties 1 et 5

Les fibres sont divisées en deux parties de 1,50 m, les deux extrémités étant raccordées d'une part à l'entrée du faisceau laser et d'autre part à la sortie vers le système d'analyse de la fluorescence (cf. figure (III).3, a et b). Chaque ensemble est protégé par une gaine en PVC.

a) Entrée du faisceau laser

Une seule fibre va guider le faisceau excitateur jusqu'à la plaque recouverte par les molécules fluorescentes. L'extrémité reliée à la partie 1 est munie d'un connecteur SMA permettant un raccord parfait.

b) Sortie vers la partie 5

Six fibres rassemblées en anneau (cf. figure (III).3 b) vont permettre de récupérer l'émission de fluorescence et la transmettre au système d'analyse. L'extrémité est aussi munie d'un connecteur SMA.

III.233. Contact avec la surface modifiée

Sur 0,10 m, les sept fibres sont rassemblées pour former la géométrie décrite sur la figure (III).3 c, la monofibre se retrouvant au centre des six autres. L'extrémité est également munie d'un connecteur SMA.

Le faisceau de fibres arrive perpendiculairement à la surface de la silice greffée par un orifice situé dans la partie supportant la plaque. Cet orifice est excentré pour permettre, pour une même plaque par simple rotation, une optimisation de l'émission de fluorescence. En effet, l'inhomogénéité du greffage (cf. § II.4) va engendrer une surface non équivalente en tous points et nous devons obtenir l'intensité de fluorescence maximale. Il sera donc nécessaire d'exciter là où le fluorophore est en quantité suffisante.

III.24. Parties 3 + 4 : partie active

III.241. Surface modifiée par le fluorophore (partie 4)

a) Type de surface et géométrie

Nous avons choisi d'après les résultats du chapitre II.435 de greffer une surface en silice pure. La silice utilisée, de qualité Suprasil, provient des Etablissements Thuet Biechelin (Bolsheim, 67).

Les pièces utilisées sont des disques d'1 cm de diamètre et d'épaisseur 1 mm (vendus sous la référence 477).

b) Protocole de modification

Chaque surface est modifiée suivant le protocole établi dans le chapitre II.435.

Ainsi, les étapes suivantes sont-elles requises :

- activation de la surface par un mélange d'acides sulfurique et nitrique concentrés (respectivement 36 N et 14 N) à reflux (90°C) pendant 1 heure,
- lavage de la surface à l'eau déminéralisée et à l'acétone,
- séchage au four à 105°C pendant une nuit,
- silanisation suivant le mode ha : immersion de la surface partiellement réhydratée (par une précédente immersion pendant 30 s dans l'eau déminéralisée) pendant 5 h à 70°C dans un mélange APTES/toluène à 10 %, en milieu totalement anhydre,
- lavage au toluène et à l'acétone,
- couplage chimique avec le fluorophore dans un mélange de toluène (10 mL), d'acide 4-(1-pyrényl)butyrique (100 mg), de 1,3-dicyclohexylcarbodiimide (100 mg) et d'1-hydroxybenzotriazole (100 mg) pendant 24 h à température ambiante,
- lavage au toluène et à l'acétone,
- traitement au N,N-diméthylformamide pour enlever toute trace d'APB adsorbé par immersions consécutives dans des volumes de 10 mL (cf. schéma des étapes de la désorption, figure (II).16).

III.242. Système de maintien de la surface (4)

Le disque est maintenu sur le support décrit sur la figure (III).4 par quelques points de colle (la surface peut ensuite être décollée facilement pour être remplacée). La surface greffée est ainsi en contact avec la fibre optique excitatrice. Préalablement, la face ainsi en contact est essuyée plusieurs fois avec un papier filtre imprégné de soude 1 M pour enlever les molécules greffées non en contact avec le milieu extérieur où s'effectueront les mesures, ceci afin de réduire la fluorescence des molécules non en présence d'oxygène.

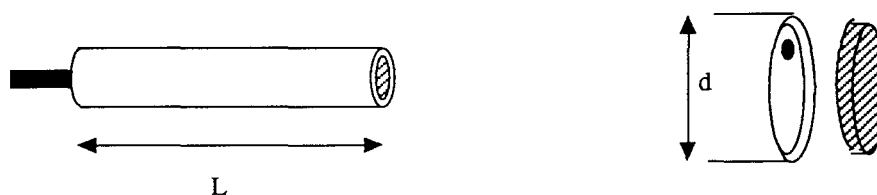


Figure (III).4.
Dispositif de maintien de la surface modifiée dans le capteur.
 $d = 14 \text{ mm}$ et $L = 150 \text{ mm}$.

Le support est un long tube creux en PVC. Ce tube peut être rendu étanche et être plongé dans le milieu à analyser (dans notre cas, l'eau d'un réacteur).

III.25. Partie 5 : Système d'analyse de l'émission de fluorescence

Les six fibres optiques en anneau sont directement reliées à l'entrée du monochromateur d'émission d'un spectrofluorimètre Jobin-Yvon 3D (figure (III).5). Ce monochromateur a une focale de 200 mm et une ouverture de $f/3,5$. Il est possible de faire défiler les longueurs d'onde grâce à un moteur débrayable, dont la vitesse est fixée à 60 nm/min. Ce spectrofluorimètre est équipé d'une sortie analogique 100 mV pleine échelle, pour enregistrement.

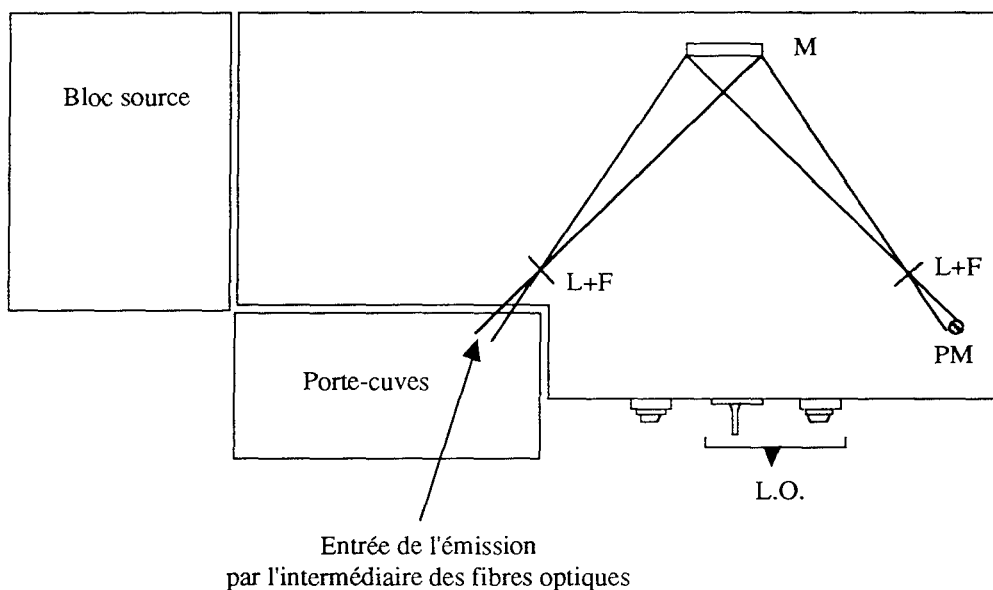


Figure (III).5.
Schéma optique dans le spectrofluorimètre
L+F : lentilles et fentes d'émission,
PM : photomultiplicateur,
L.O. : système de réglage des longueurs d'onde d'émission,
M : miroir.

Les spectres obtenus peuvent être de deux types :

- la longueur d'onde d'émission varie par l'intermédiaire des moteurs, la fluorescence émise sera enregistrée en fonction de la longueur d'onde d'émission (spectre d'émission de fluorescence pour une longueur d'onde d'excitation donnée),
- la longueur d'onde d'émission est fixée, la fluorescence émise sera enregistrée en fonction du temps.

III.3. DROITE DE STERN-VOLMER

III.31. Théorie

L'effet de l'oxygène sur la luminescence des colorants immobilisés sur des adsorbants inorganiques fut observé et publié dans une série d'articles par Kautsky et Hirsch dans les années 30 [Kautsky, 1939 ; Kautsky et Hirsch, 1935]. Ce phénomène d'inhibition ("quenching") est apparemment général et il est intéressant de noter que le plus simple des aromatiques, le benzène, a une des plus fortes sensibilités à l'inhibition par l'oxygène.

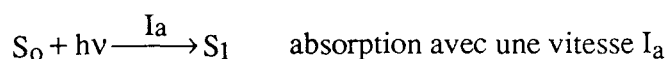
La fluorescence des dérivés du pyrène est aussi affectée par la présence d'oxygène dans le milieu.

Le processus d'inhibition de fluorescence est généralement interprété en terme de formation d'un complexe de transfert de charge après collision entre l'oxygène et le fluorophore excité ("oxciplexe"). Une transition non radiative permet à ce complexe de revenir à un état stationnaire mais thermodynamiquement instable. Ce qui engendre une dissociation rapide donnant d'un côté le fluorophore et de l'autre l'oxygène non consommé.

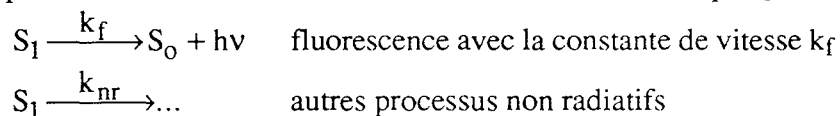
Une bonne sensibilité à l'inhibition par l'oxygène demande une durée de vie naturelle de l'état excité importante. C'est le cas pour l'APB dont la durée de vie est supérieure à 100 ns.

Détermination de la loi de Stern-Volmer :

Considérons une molécule M dans l'état singulet non excité S_0 . Par absorption de photons, cette molécule passe à l'état excité S_1 avec une vitesse I_a :



Cette molécule peut retourner à l'état fondamental par plusieurs processus, et entre autres, par émission de fluorescence avec une constante de temps k_f :



Lorsque l'excitation des molécules est continue et constante en intensité dans le temps, le nombre de molécules promues en un temps donné dans un état excité électronique après excitation, est égal au nombre de molécules dans cet état qui disparaissent du milieu durant le même intervalle de temps : les vitesses d'apparition et de disparition des molécules excitées sont égales et la concentration en espèces excitées est stationnaire.

Si $[S_1]$ désigne la concentration en molécules excitées dans l'état S_1 , nous pouvons écrire :

$$\frac{d[S_1]}{dt} = 0$$

Soit :

$$\frac{d[S_1]}{dt} = I_a - (k_f + k_{nr})[S_1]$$

conduisant à la détermination de la concentration stationnaire en S_1 :

$$[S_1] = \frac{I_a}{\sum k}$$

La vitesse (ou intensité) du processus de fluorescence s'exprime par :

$$I_o = k_f[S_1]$$

Si, de plus, le milieu contient un inhibiteur à la concentration $[Q]$, un nouveau processus de désactivation de S_1 peut intervenir :



Dans ce cas :

$$\frac{d[S_1]}{dt} = 0 = I_a - \sum k[S_1] - k_Q[Q][S_1]$$

ce qui conduit à :

$$S_1 = \frac{I_a}{\sum k + k_Q[Q]}$$

et à :

$$I = \frac{k_f I_a}{\sum k + k_Q[Q]}$$

En exprimant le rapport $\frac{I_0}{I}$ des intensités de fluorescence de la substance en l'absence et en présence d'inhibiteur Q, toutes autres choses égales par ailleurs, on obtient l'expression analytique de la droite de Stern-Volmer :

$$\frac{I_0}{I} = 1 + \frac{k_Q}{\sum k} [Q] = 1 + k_Q \tau_0 [Q]$$

Cette expression fondamentale dans l'étude cinétique des processus primaires, permet en particulier d'obtenir la durée de vie naturelle de la molécule excitée (τ_0), ou connaissant cette dernière valeur, la constante de vitesse k_Q d'inhibition ou de transfert d'énergie.

III.32. Objectif

La constante de vitesse k_Q intervenant dans la loi de Stern-Volmer dans le cas de notre capteur est directement liée au transfert de l'oxygène vers la surface où se trouve immobilisé l'APB. En effet, cette constante dépend en règle générale de la diffusion de l'inhibiteur vers le fluorophore et inversement. Lorsque ce dernier est immobilisé, k_Q ne dépend plus que de la diffusion de l'inhibiteur. Ainsi, la détermination de cette constante en milieu statique nous donnera le coefficient de transfert de l'oxygène vers la surface dans le cas d'une géométrie particulière liée à la construction de notre capteur.

En milieu dynamique, la détermination de la constante nous donnera la valeur du coefficient de transfert dans la couche limite (cf. § III.4).

Afin de connaître la valeur de la constante totale d'inhibition (produit $k_Q \tau_0$) pour notre capteur nous avons donc cherché une méthode pour faire varier la concentration en oxygène dissous dans le milieu aqueux statique. Parmi les possibilités offertes, nous en avons choisi deux. La première est l'utilisation d'un consommateur d'oxygène (substance qui va s'oxyder en présence d'oxygène). Cette méthode présente l'avantage d'être simple et efficace, mais nous devons nous assurer que cette substance ne détruit pas le greffage. La deuxième est le dégazage total ou partiel par bullage d'azote. Un simple bullage d'oxygène réapprovisionnera le milieu.

III.33. Utilisation d'un consommateur d'oxygène

Les solutions de sulfite de sodium s'oxydent lentement en présence d'oxygène moléculaire. Fuller et Crist [1941] ont déterminé la constante de la vitesse de réaction de l'oxydation des sulfites par l'oxygène. Les résultats relatifs à des concentrations en sulfites variant de 0,01 à 0,05 mol/L donnent une constante de vitesse $k = 0,013 \text{ s}^{-1}$ à 25°C. Nous avons choisi de tester différentes solutions aqueuses de sulfite de sodium.

Pour être acceptable, un "bon" consommateur d'oxygène devra réduire l'inhibition de la fluorescence, donc augmenter l'intensité mesurée et ne pas détruire le greffage. La vitesse de la réaction n'est pas primordiale.

La configuration finale du capteur n'ayant pas encore été décidée lorsque cette étude a été entreprise, nous avons utilisé des plaques en silice rectangulaires et le spectrofluorimètre SPEX.

III.331. Conditions expérimentales

a) Greffage de la surface

Une seule plaque est utilisée pour chacune des solutions testées. Elle a été greffée suivant le mode de silanisation ha (silanisation en milieu anhydre avec polymérisation horizontale du silane sur la surface) et a subi un traitement de désorption au DMF.

b) Mode opératoire

Dans une cuve contenant 2,5 mL d'eau déminéralisée, la plaque est maintenue grâce au système décrit sur la figure (II).25. La cuve est placée dans la cavité d'analyse du spectrofluorimètre SPEX et l'analyse de fluorescence est réalisée en continu sur une base de temps de deux heures en excitant la surface à 337 nm et en mesurant l'émission à 376 nm.

Le consommateur est ajouté progressivement : un volume de 5 μL est retiré de la cuve contenant la plaque greffée et un volume identique d'une solution contenant le sulfite est ajouté immédiatement. Ceci est répété toutes les 10 minutes. Entre chaque ajout de sulfite, la valeur de l'intensité de fluorescence émise est relevée toutes les minutes.

Le tableau (III).2 donne les valeurs des concentrations en consommateur des solutions aqueuses utilisées pour chaque test.

Tableau (III).2.
Tableau des concentrations en consommateurs d'oxygène.

Consommateur	Concentrations (10^{-4} mol/L)	
Sulfite de sodium (Na_2SO_3)	▲ : 4	● : 8
	□ : 12	◆ : 16

III.332. Résultats et conséquences

Les résultats des quatre tests correspondant aux quatre concentrations en sulfite sont regroupés dans la figure (III).6. Pour permettre une comparaison entre les différents tests, nous avons rapporté la valeur de l'intensité de fluorescence à l'instant t à celle à l'instant $t = 0$. Chaque ensemble de points pour une concentration donnée en sulfite dans la cuve, correspond à la valeur du rapport I/I_0 relevé toutes les minutes.

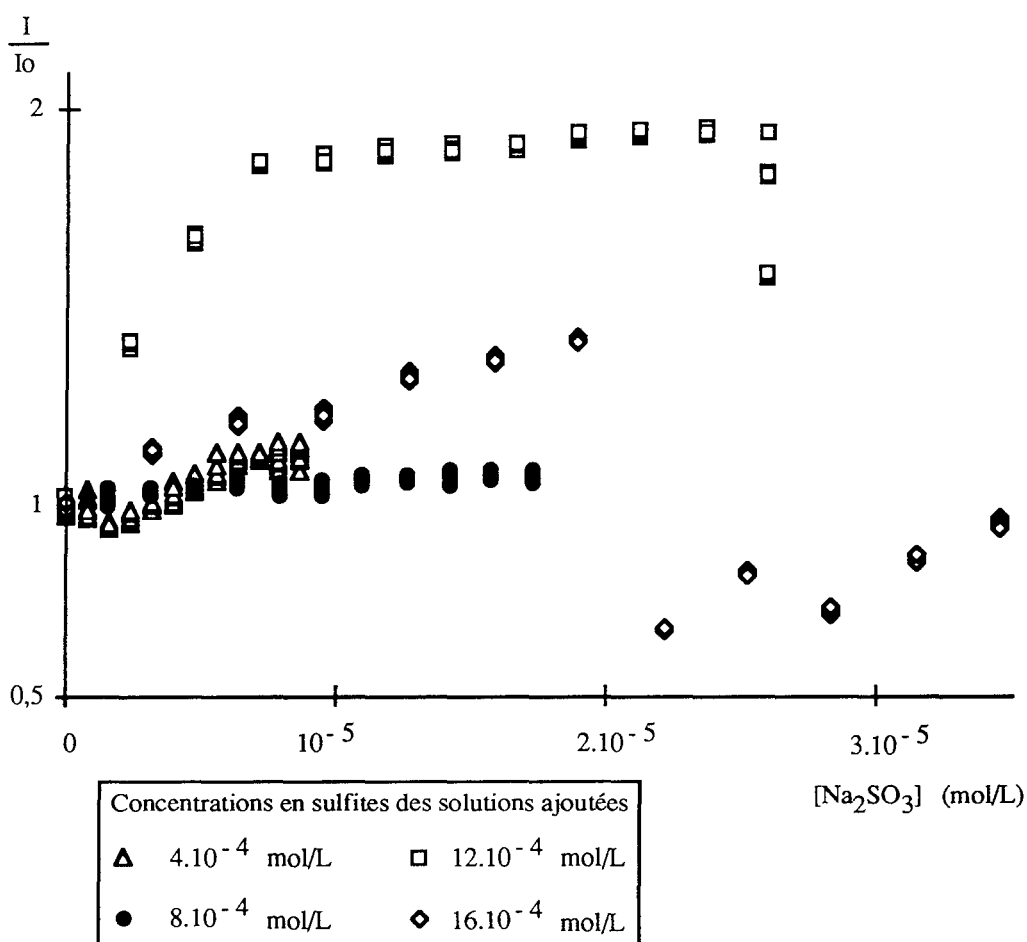


Figure (III).6.
Intensités de fluorescence relatives
en fonction de la concentration en sulfites dans le milieu
pour différentes concentrations initiales de sulfite de sodium
(ajout toutes les 10 minutes et mesure de la fluorescence toutes les minutes).

D'après les courbes, seule une concentration initiale en sulfite de $12 \cdot 10^{-4}$ mol/L donne des résultats en accord avec les hypothèses, à savoir une augmentation de l'intensité de fluorescence (consommation d'oxygène due à l'ajout de sulfites) et une stabilisation (due à la consommation totale d'oxygène). En ce qui concerne les courbes obtenues pour des concentrations initiales de $4 \cdot 10^{-4}$ et $8 \cdot 10^{-4}$ mol/L, la consommation d'oxygène n'est pas assez forte pour engendrer une augmentation de la fluorescence. Les résultats sont satisfaisants mais il faut signaler une possible détérioration par de trop fortes concentrations en sulfites (cas de la courbe pour une concentration initiale de $12 \cdot 10^{-4}$ mol/L dont l'intensité de fluorescence diminue au cours de la dernière injection de sulfite). Cette détérioration est confirmée par la dernière courbe ($16 \cdot 10^{-4}$ mol/L) qui devrait avoir le même comportement que la précédente ($12 \cdot 10^{-4}$ mol/L) en ce qui concerne l'augmentation de l'intensité puisque nous avons travaillé sur la même plaque. Or, il apparaît que l'intensité est plus faible, ce qui correspondrait à une perte de molécules d'APB.

III.333. Conclusion

Les résultats nous ont contraints à envisager une méthode moins perturbante pour le greffage. Nous n'avons donc pas cherché à obtenir la loi donnant la valeur de l'intensité en fonction de la concentration en oxygène dans le cas d'une consommation par les sulfites.

III.34. Dégazage par l'azote

Cette méthode semble la plus adéquate pour l'étude finale, car le capteur doit pouvoir être utilisé dans un environnement biphasique liquide-gaz.

III.341. Conditions expérimentales et mode opératoire

a) Conditions expérimentales et appareils de mesure

Un disque en silice pure est greffé suivant le mode ha puis traité au DMF. Il est placé dans l'emplacement prévu sur la partie active du capteur.

Le système d'excitation, ainsi que le système de guidage de la lumière sont identiques à ceux décrits au § III.22.

L'émission de fluorescence est, quant à elle, récupérée au bout des six fibres émettrices par le système d'analyse du spectrofluorimètre SPEX (photomultiplicateur couplé à une acquisition des données sur PC). Les fentes d'émission de fluorescence sont réglées à 0,5 nm.

La concentration en oxygène est mesurée en mg/L parallèlement par une sonde oxygène-température O2T-CE (Poncell Mesure).

b) Mode opératoire

Pour obtenir chaque concentration en oxygène, nous avons fait buller de l'azote ou de l'oxygène (suivant la concentration initiale en oxygène) dans un ballon contenant 250 mL d'eau déminéralisée et agitée par un barreau aimanté. Au bout d'un temps t de dégazage, choisi aléatoirement, l'arrivée du gaz est coupée et l'alimentation du barreau aimanté éteinte. La partie active du capteur est alors plongée dans l'eau immobile contenue dans le ballon. L'intensité de fluorescence à 376 nm est mesurée et la concentration en oxygène donnée par la sonde est relevée.

Pour chaque concentration en oxygène, nous avons réalisé trois mesures de l'intensité de fluorescence. L'intensité donnée dans les résultats est la moyenne des trois intensités à 376 nm.

III.342. Résultats

Les résultats sont présentés dans le tableau (III).3. La température ne varie pas pendant toute la durée des tests (elle est restée égale à 20°C). La figure (III).7 représente le rapport $\frac{I_0}{I}$ en fonction des valeurs de la concentration en oxygène dissous.

Tableau (III).3.
Valeurs pour la droite de Stern-Volmer
obtenues avec le capteur dans l'eau.

Concentration (mg/L)	Concentration (10 ⁻⁵ mol/L)	$\frac{I_0}{I}$ (u.a.)
1,8	5,6	1,06
1,9	5,9	1,03
3,9	12,2	0,99
5,4	16,9	1,02
6,5	20,3	1,04
7,2	22,5	1,22
7,2	22,5	1,04
9	28,1	1,06
11,3	35,3	1,16
11,3	35,3	1,13
13,2	41,2	1,13
15,9	49,7	1,23
17,1	53,5	1,14
18,4	57,5	1,39
22	68,8	1,25
25,1	78,5	1,39
33	103,1	1,35

Une régression linéaire sur ces valeurs nous donne :

$$\frac{I_0}{I} = a[O_2] + b$$

avec : $a = 412,93 \text{ L/mol}$

$b = 0,996$

$r^2 = 0,727$

Nous trouvons le coefficient d'inhibition totale $k_Q\tau_0 = 412,9$.

Ce calcul nous permet d'affirmer que $b \approx 1$.

III.343. Conclusions

Le calcul de la constante de Stern-Volmer a été effectué par la méthode de recherche de Newton. L'équation de la droite de Stern-Volmer s'écrit alors :

$$\frac{I_0}{I} = 1 + 412,9 [O_2]$$

avec $[O_2]$ exprimée en mol/L.

Bellil [1994] dans un précédent travail a déterminé la valeur de la constante de Stern-Volmer de l'APB dissous dans l'eau déminéralisée ($[APB] = 10^{-5} \text{ mol/L}$). Ses résultats sont donnés dans le tableau (III).4.

Tableau (III).4.
Valeurs de la constante de Stern-Volmer
de l'APB dissous dans l'eau ($[APB] = 10^{-5} \text{ mol/L}$)
en fonction de la température [Bellil, 1994].

Température (°C)	K_s (L/mol)
4,3	235
9,8	297
15,0	438
20,6	477
25,0	618
29,8	671
34,0	731

La valeur que nous trouvons à 20°C est du même ordre de grandeur que celle obtenue par Bellil. La légère différence peut provenir de ce que nous avons une configuration différente. En effet, dans le cas des résultats de Bellil, les valeurs sont obtenues en mettant en présence de l'APB et de l'oxygène tous les deux libres en milieu liquide. Nous avons de notre côté travaillé avec le fluorophore fixé sur une surface plongée dans un milieu liquide. La constante d'inhibition ne dépend plus que de la diffusion de l'oxygène vers le fluorophore. C'est pourquoi, nous obtenons une constante légèrement plus faible.

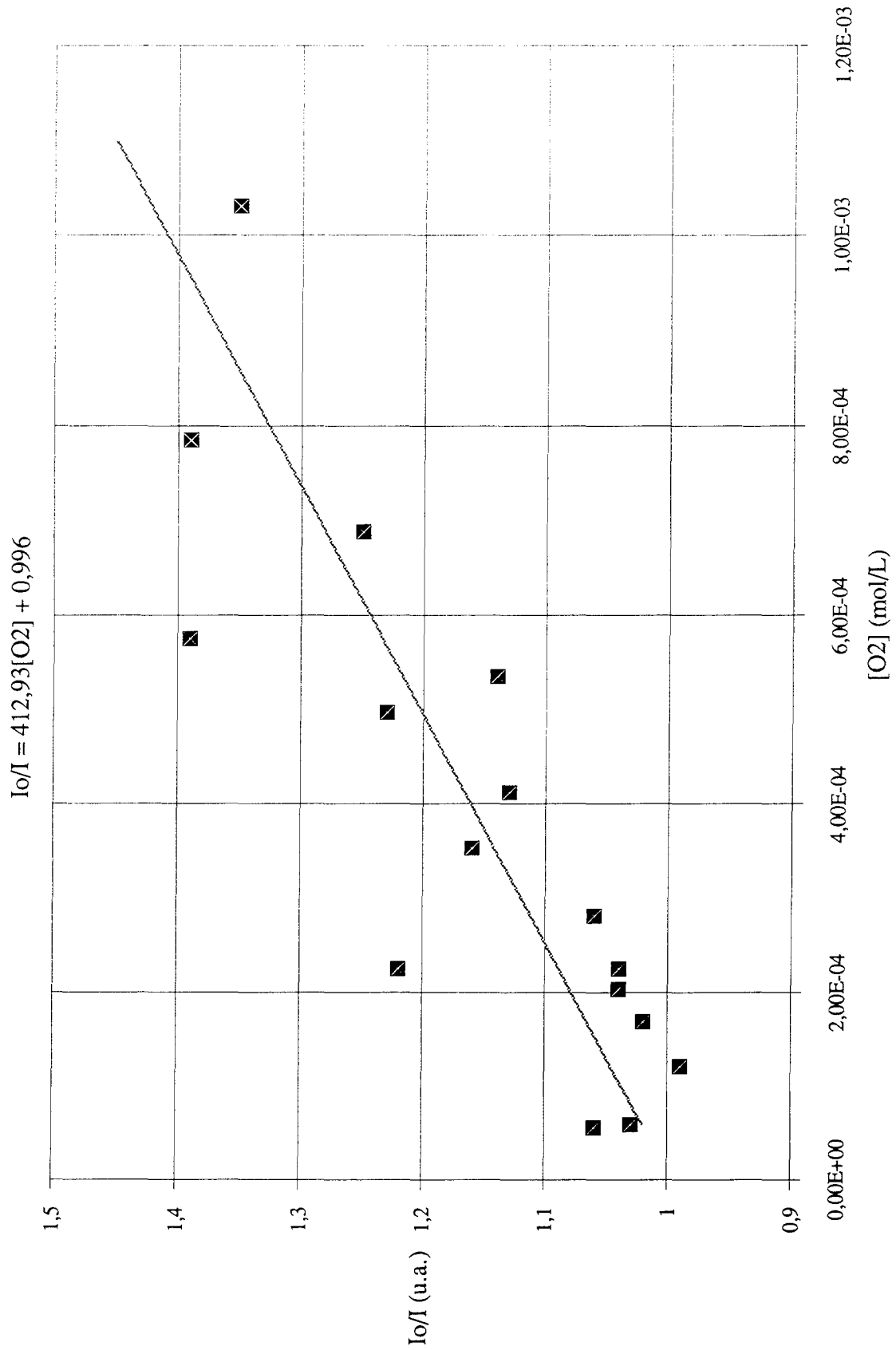


Figure (III).7.
Droite de Stern-Volmer pour le capteur plongé dans l'eau.

III.4. MISE EN ŒUVRE DU CAPTEUR

III.41. Conditions expérimentales et matériel

La configuration du capteur est celle décrite au § (III).2. Le système d'analyse de l'émission de fluorescence est celui décrit au § (III).25, c'est-à-dire que les fibres émettrices sont reliées à l'entrée du monochromateur Jobin-Yvon. Ce choix a été fait pour pouvoir déplacer le capteur et son système d'excitation-émission (*i.e.* laser + spectrofluorimètre) vers le réacteur où doivent s'effectuer les mesures.

Dans un premier temps, nous avons testé le capteur dans une cuve agitée remplie avec deux litres d'eau déminéralisée. Un bullage d'azote est utilisé pour faire varier la concentration en oxygène dissous. Un barreau aimanté règle l'agitation.

Une sonde oxygène/température (oxymètre à mémoire IP66, cellox 325, Bioblock) avec un temps de réponse τ_1 de l'ordre de 10 s, est utilisée pour mesurer en continu la concentration en oxygène dissous et la température.

III.42. Mode opératoire

Une cuve de 3 L est remplie d'eau déminéralisée puis saturée en oxygène par un bullage d'oxygène gazeux. Le capteur est plongé dans la cuve fortement agitée.

Un premier spectre est réalisé en faisant varier la longueur d'onde d'émission pour obtenir le spectre de fluorescence à la concentration maximale (intensité de fluorescence minimale car inhibition très forte). Ensuite, l'azote est introduit dans l'eau avec un débit engendrant des bulles dont le diamètre est inférieur à 2 cm. La longueur d'onde d'émission de fluorescence est alors bloquée à 376 nm et la variation de l'intensité est enregistrée en fonction du temps. La concentration en oxygène dissous est relevée à intervalles réguliers.

Lorsque la concentration en oxygène a atteint son minimum (intensité de fluorescence maximale car inhibition faible voire inexistante), un troisième spectre est obtenu en faisant à nouveau varier la longueur d'onde d'émission de fluorescence.

III.43. Réglages

Les deux spectres d'émission de fluorescence réalisés aux deux extrema de concentration donnent les valeurs des intensités de fluorescence à 376 nm. Pour obtenir une bonne sensibilité du capteur, il est donc nécessaire de s'assurer que la différence entre ces deux valeurs est correcte pour pouvoir se fier aux mesures réalisées par la suite.

Ainsi, dans un premier temps, est-il indispensable de régler les appareils de mesure afin d'obtenir des réponses dont le rapport signal/bruit ne perturbe pas les résultats. Pour cela, nous avons réalisé une série de tests aux deux extrema de concentration en oxygène dissous pour déterminer les paramètres à ajuster.

Le réglage des appareils de mesure comprend non seulement le système d'analyse de l'émission mais aussi la partie active du capteur. En effet, nous avons constaté (§ (II).3 et (II).4) une inhomogénéité du greffage sur la surface, même dans les conditions de modifications utilisées (silanisation ha). Il est donc nécessaire d'optimiser la réponse du capteur avant même de faire varier la concentration en inhibiteur. Pour cela, le support du disque a été fait de telle manière (cf. figure (III).4) que l'arrivée du faisceau de fibres sur la surface soit excentrée. Ainsi, est-il possible d'exciter plusieurs endroits sur la même plaque par une simple rotation du disque.

III.44. Résultats

III.441. Réglages

Après plusieurs tests sur plusieurs plaques greffées de façon identique, nous avons dû travailler avec des fentes maximales à l'émission, c'est-à-dire de 10 nm. Bien sûr, les pics du spectre d'émission de fluorescence sont élargis mais en utilisant des fentes plus fines, la réponse du capteur est indétectable.

III.442. Résultats

Les résultats pour chaque analyse sont de deux types :

- deux spectres d'émission de fluorescence de l'APB greffé sur la plaque pour deux concentrations en oxygène dissous différentes (une minimale et une maximale),
- un enregistrement donnant la variation de l'intensité de fluorescence à 376 nm en fonction de la concentration en oxygène pendant le bullage d'oxygène.

a) Spectres d'émission de fluorescence

Les figures (III).8 à (III).11 montrent les spectres d'émission de fluorescence obtenus aux extrema de concentration en oxygène dissous.

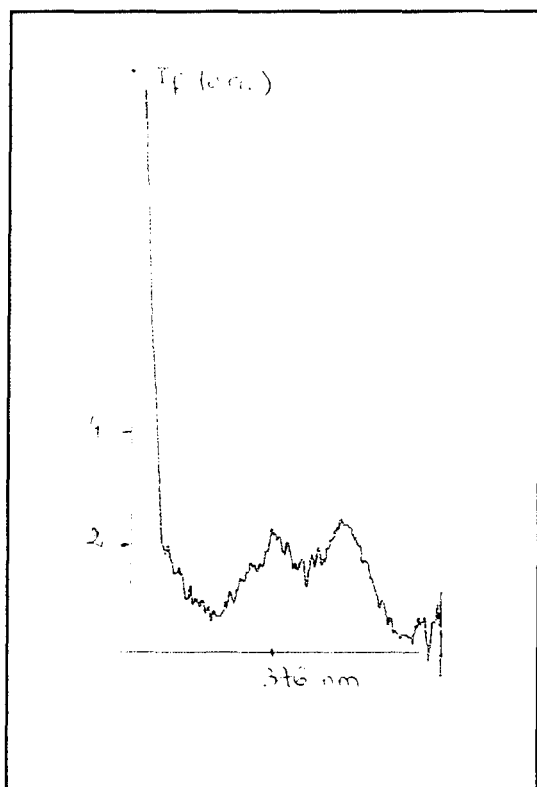


Figure (III).8.
Spectre d'émission de fluorescence du capteur.
Série 1
[O₂] = 2,4 mg/L.

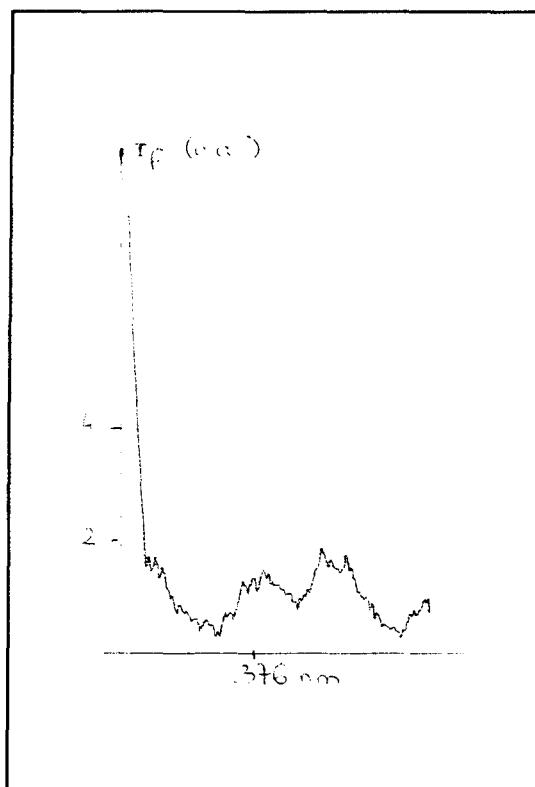


Figure (III).9.
Spectre d'émission de fluorescence du capteur.
Série 1
[O₂] = 18,5 mg/L.

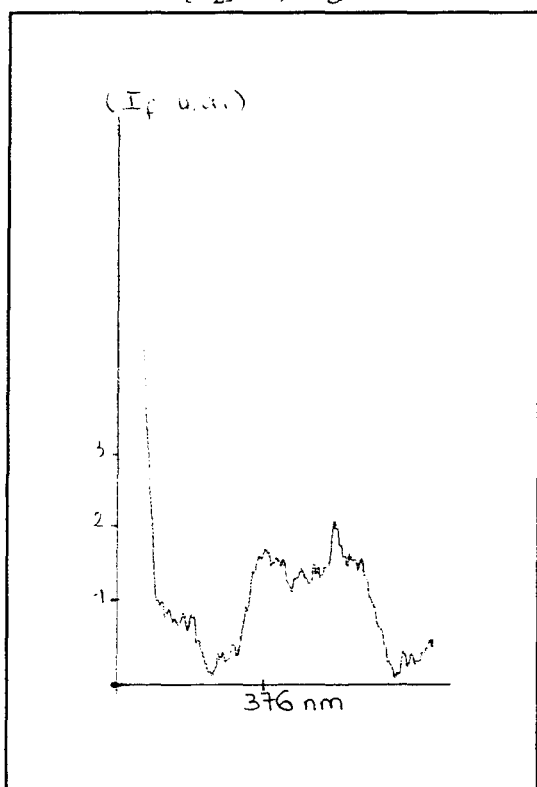


Figure (III).10.
Spectre d'émission de fluorescence du capteur.
Série 2
[O₂] = 1,6 mg/L.

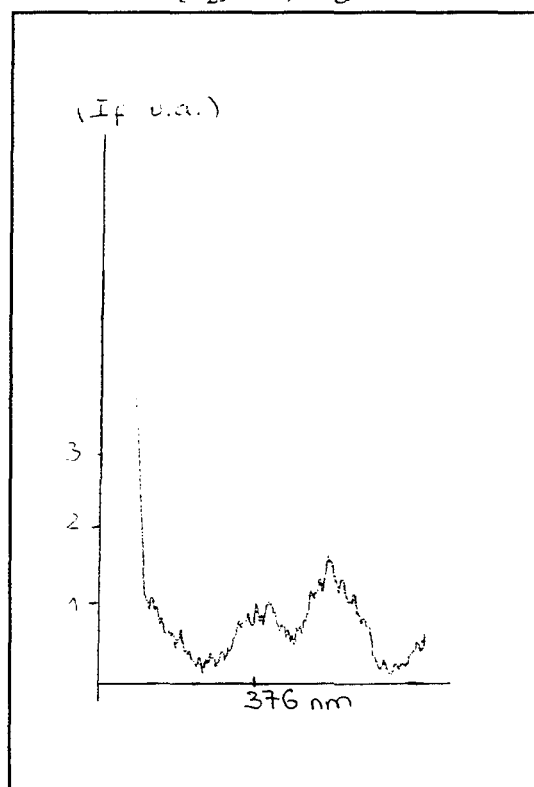


Figure (III).11.
Spectre d'émission de fluorescence du capteur.
Série 2
[O₂] = 13,0 mg/L.

b) Variation d'intensité de fluorescence

Les tableaux (III).5 et (III).6 donnent les valeurs des intensités de fluorescence en fonction du temps et de la concentration lue sur l'oxymètre pendant le dégazage de la solution.

Tableau (III).5.
Réponse du capteur en fonction de la concentration en oxygène dissous - Série 1.

Temps (s)	Concentration (mg/L)	Concentration (mol/m ³)	Intensité (u.a.)	$\frac{I}{I}$ (u.a.)
828	18,6	0,581	5,1	0,196
792	18,07	0,565	5,15	0,194
756	17,46	0,546	5,15	0,194
720	16,84	0,526	5,18	0,193
684	16,65	0,520	5,2	0,192
648	16,44	0,514	5,23	0,191
612	15,43	0,482	5,25	0,190
576	15,04	0,470	5,3	0,188
540	14,45	0,452	5,3	0,188
504	14,06	0,439	5,32	0,187
468	13,48	0,421	5,35	0,186
432	12,53	0,392	5,38	0,185
396	12,15	0,380	5,4	0,185
360	11,59	0,362	5,42	0,184
324	11,23	0,351	5,45	0,183
288	10,32	0,323	5,5	0,181
252	8,9	0,278	5,6	0,178
216	7,69	0,240	5,65	0,176
180	6,85	0,214	5,7	0,175
156	5,85	0,183	5,75	0,173
132	5,52	0,173	5,8	0,172
108	4,71	0,147	5,85	0,170
84	3,92	0,123	5,9	0,169
60	3,14	0,098	5,95	0,168
36	2,68	0,084	6	0,166
12	2,4	0,075	6,05	0,165

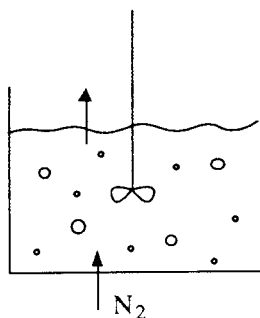
Tableau (III).6.

Réponse du capteur en fonction de la concentration en oxygène dissous - Série 2.

Temps (s)	Concentration (mg/L)	Concentration (mol/m ³)	Intensité (u.a.)	$\frac{1}{I}$ (u.a.)
816	12,98	0,406	5,8	0,172
780	12,33	0,385	5,85	0,170
756	11,19	0,350	5,9	0,169
732	10,97	0,343	5,95	0,168
708	9,90	0,309	5,98	0,167
684	9,14	0,286	6,02	0,166
660	8,75	0,273	6,05	0,165
636	7,82	0,244	6,1	0,1639
612	7,49	0,234	6,12	0,163
588	7,01	0,219	6,15	0,162
564	6,76	0,211	6,15	0,162
540	6,53	0,204	6,18	0,161
516	6,45	0,202	6,2	0,161
492	6,21	0,194	6,2	0,161
468	5,90	0,184	6,2	0,161
444	5,74	0,179	6,23	0,160
420	5,43	0,170	6,25	0,160
396	4,79	0,150	6,3	0,159
372	4,66	0,146	6,3	0,159
348	4,52	0,141	6,32	0,158
324	4,35	0,136	6,32	0,158
300	3,98	0,124	6,35	0,157
276	3,90	0,122	6,35	0,157
252	3,64	0,114	6,4	0,156
204	3,15	0,098	6,4	0,156
156	2,87	0,090	6,4	0,156
108	2,42	0,076	6,45	0,155
60	1,69	0,053	6,5	0,154
12	1,60	0,050	6,5	0,154

III.45. Exploitation des résultats

Si C_L est la concentration en oxygène dissous, la désoxygénation à l'azote s'écrit :



$$-\frac{dC_L}{dt} = k_L a (C_L - \frac{C_G}{m}) \quad (1)$$

$k_L a$ est le coefficient de transfert volumique (s^{-1}) et $m = \frac{C_G}{C_L}$ correspond à l'équilibre de dissolution de l'oxygène dans l'eau.

Si le débit de gaz est assez grand, C_G varie peu dans le gaz (azote) et on pourra supposer la variation voisine de 0.

Ainsi :

$$-\frac{dC_L}{dt} = k_L a C_L \quad (2)$$

Par ailleurs, une sonde quelconque, avec un temps de réponse τ_1 , considérée comme un système linéaire du premier ordre, fournit, en réponse à C_L , une indication C_m telle que :

$$\frac{dC_m}{dt} = \frac{1}{\tau_1} (C_L - C_m) \quad (3)$$

La résolution des équations (2) et (3) avec :

$$\text{à } t = 0 \quad C_L = C_{L_0} = C_m$$

fournit :

$$\boxed{\frac{C_m}{C_{L_0}} = \frac{1}{1 - k_L a \tau_1} \exp(-k_L a \tau_1 t) - \frac{k_L a \tau_1}{1 - k_L a \tau_1} \exp\left(-\frac{t}{\tau_1}\right)} \quad (4)$$

Pour une sonde à réponse instantanée, il vient simplement :

$$\frac{C_L}{C_{L_0}} = \exp(-k_L a t) \quad (5)$$

Pour un capteur optique :

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_S C_L \quad (6)$$

(6) + (5) donne :

$$\boxed{\frac{1}{I} = \frac{1}{I_0} + \left(\frac{1}{I_{(t=0)}} - \frac{1}{I_0}\right) \exp(-k_L a t)} \quad (7)$$

$I_{(t=0)}$: intensité de fluorescence à l'instant initial

I_0 : intensité de fluorescence en absence d'inhibiteur

Par ailleurs, la constante de temps de la sonde à oxygène ($\tau_1 < 10$ s) est faible devant $\frac{1}{k_L a} \approx 1000$ s.

On peut donc supposer que $C_m \approx C_L$, de sorte que la concentration C_m lue sur la sonde à oxygène fournit à peu près en temps réel la concentration en oxygène dissous. Cette mesure permet d'établir le lien :

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_S C_L \quad (8)$$

Cette relation, optimisée pour les expériences, fournit une seule et même valeur de K_S .

Tableau (III).7.
Valeur de la constante K_S .

Série	$1/I_0$ (u.a.)	K_S (m^3/mol)
1	0,1625	0,35
2	0,1512	

L'essai en milieu statique avait fourni pour K_S une valeur de $0,413 m^3/mol$.

L'optimisation de la relation (7) sur les résultats expérimentaux avec les valeurs de $1/I_0$ qui précèdent conduisent aux résultats représentés sur les figures (III).12 à 14 avec les valeurs données dans le tableau (III).8.

Tableau (III).8.
Valeurs calculées de $k_L a$.

Série	$1/I_0$	$1/I(t=0)$	$k_L a$
1	0,1625	0,1966	0,00127
2	0,1512	0,1729	0,00177

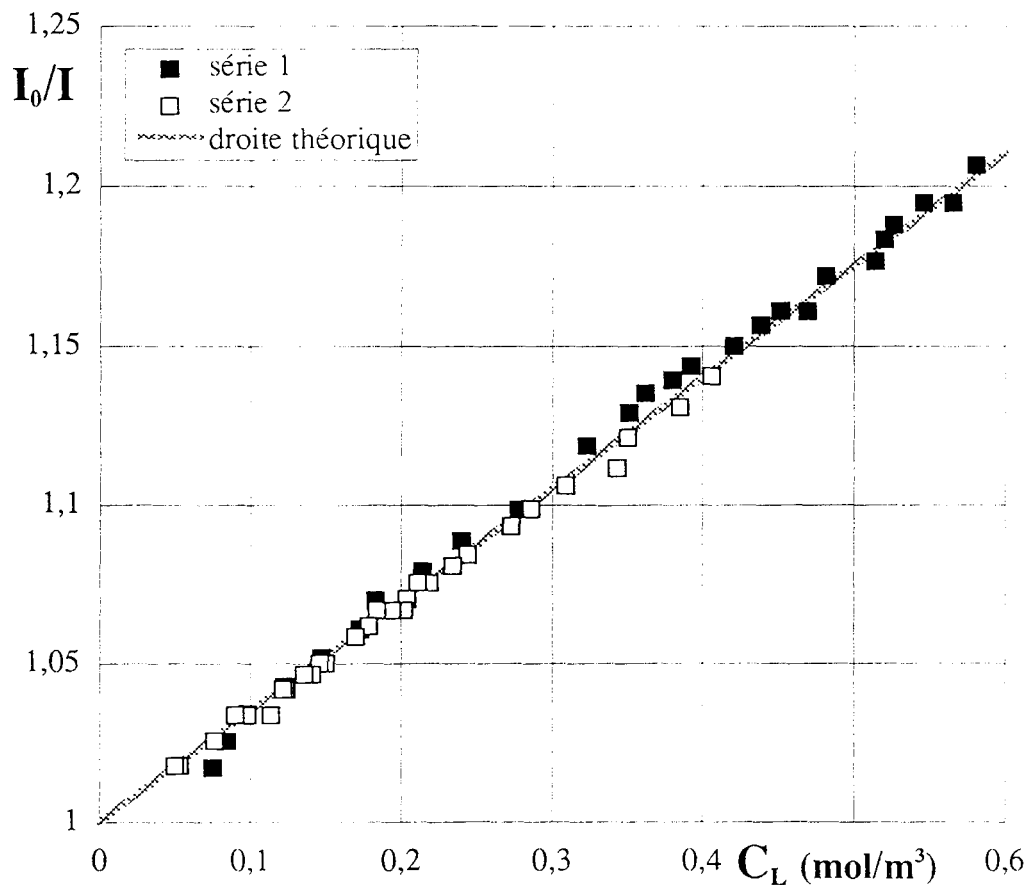


Figure (III).12.
Droite de Stern-Volmer pour les deux essais.

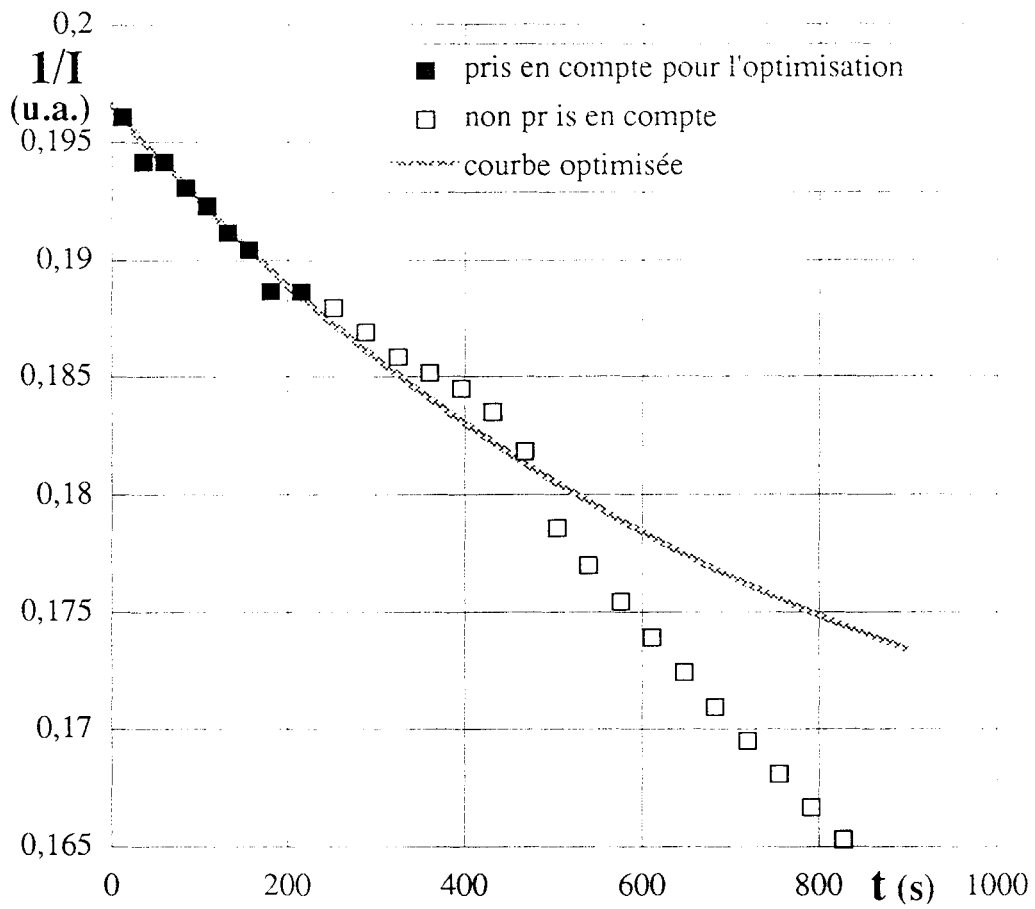


Figure (III).13.
Optimisation des résultats pour la première série de valeurs.

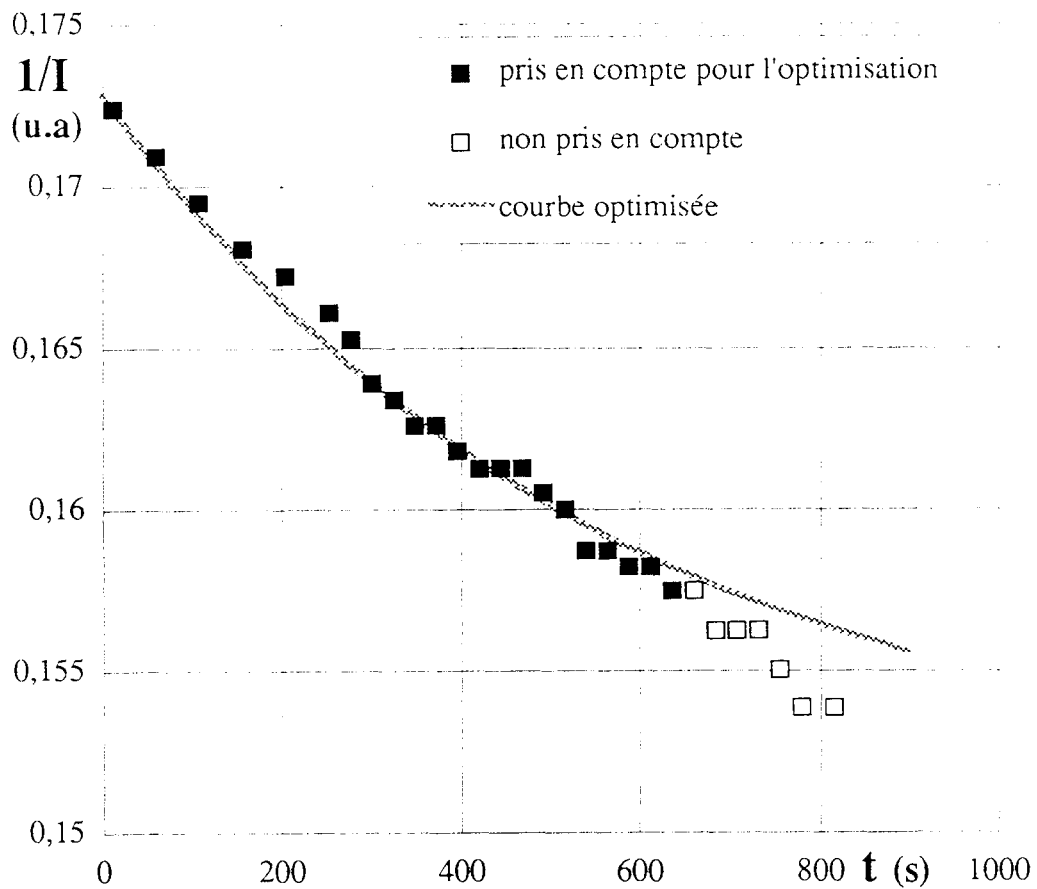


Figure (III).14.
Optimisation des résultats pour la deuxième série de valeurs.

III.46. Discussion et conclusion

Dans le cas de la deuxième série de valeurs (figure (III).14), notre sonde nous permet de déterminer la constante k_{La} pour laquelle l'application de la relation (7) est en accord avec les résultats expérimentaux, bien que les derniers points montrent une déviation par rapport au modèle proposé. Par contre, dans le cas de la première série de valeurs, seules une dizaine de valeurs sont en accord avec la relation (7). Ceci est peut être dû à une variation du débit gazeux au cours de l'expérience (celui-ci n'étant pas contrôlé).

La détermination des phénomènes de transfert à l'interface gaz-liquide au moyen de la sonde optique fabriquée est possible. Nous avons aussi constaté l'existence d'une relation linéaire entre la concentration en oxygène dissous (mesurée grâce à une sonde à membrane) et l'intensité de fluorescence émise par notre capteur (figure (III).12).

Cependant, la différence entre les intensités de fluorescence mesurées à 376 nm aux extrema de concentration (figures (III).8, 9, 10 et 11) est très faible pour le domaine de concentration considéré même pour des conditions d'analyse poussées à leur maximum. Ceci pose le problème de la sensibilité de notre capteur. Dans le chapitre qui suit, nous avons exposé les différentes améliorations envisageables pour pallier ce défaut.

CHAPITRE IV

Perspectives et conclusion

IV.1. AMELIORATION DU CAPTEUR

IV.11. Données imposées au départ

L'objectif du capteur était au départ de pouvoir mesurer les fluctuations locales de la concentration en oxygène dissous dans l'eau dans la couche limite d'un écoulement turbulent. Ce type de mesure nécessitait l'emploi d'une sonde fluorescente, sensible aux variations de l'oxygène, greffée sur une surface plongée dans l'écoulement turbulent.

IV.111. Fluorophore

Le fluorophore utilisé, l'APB, présentait l'avantage d'avoir un rendement quantique de la fluorescence voisin de 1 et une bonne sensibilité à la présence d'oxygène (inhibition de fluorescence), et le désavantage de former des excimères intermoléculaires (cf. AIII.14.) entraînant une diminution de la réponse à l'excitation non due à l'inhibition par l'oxygène. Ainsi, un greffage trop dense (molécules très proches les unes des autres) était à éviter pour s'affranchir du problème de la formation d'excimères.

IV.112. Excitation

La mesure recherchée étant une mesure "locale", le faisceau excitateur ne devait pas être trop large (diamètre inférieur au millimètre).

L'aire de la surface greffée qui est excitée doit contenir des molécules fluorescentes en nombre suffisant pour donner une réponse. Si le faisceau est de dimension faible, les chances d'exciter des molécules fluorescentes sont grandes, d'autant plus grandes que le greffage est dense.(cf. schéma de la figure (IV).1.).

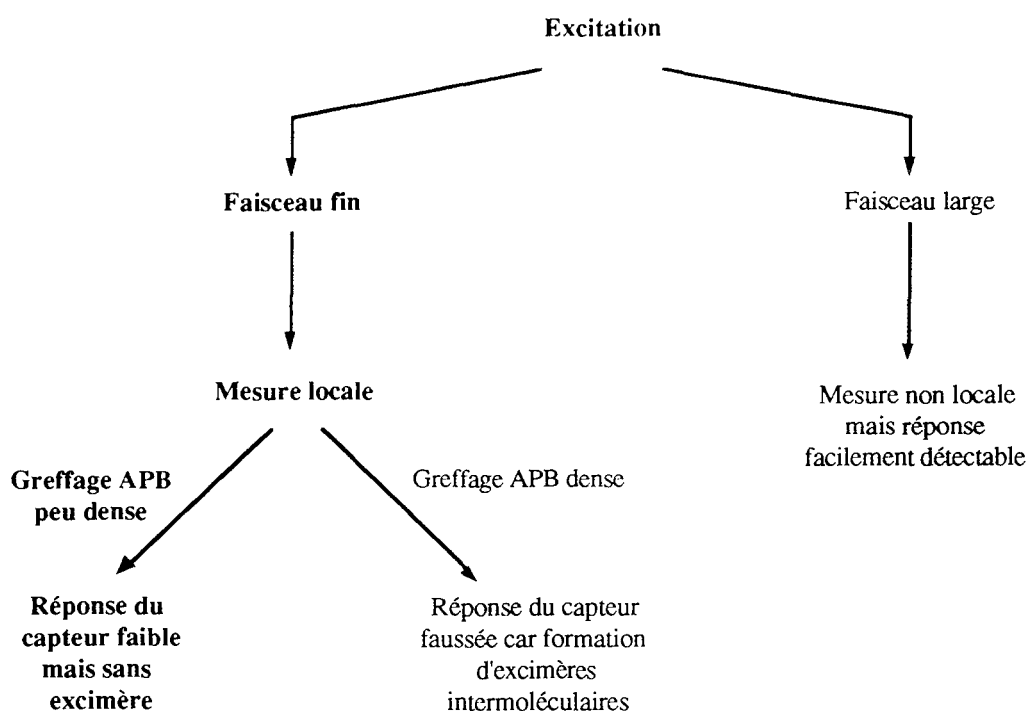


Figure (IV).1.

Compromis entre le type d'excitation, le fluorophore et le type de mesure.

IV.12. Améliorations

IV.121. Source excitatrice

Nous avons choisi une source excitatrice de type laser à azote pour deux raisons :

- la longueur d'onde fixe à 337,1 nm, compatible avec le spectre d'excitation de l'APB (cf. figure (AIII).2.),
- laser portable permettant de le déplacer facilement.

L'utilisation d'une source continue pourra être envisagée (lampe munie éventuellement d'un filtre pour sélectionner la longueur d'onde d'excitation). D'une part, une telle source excitera les molécules de manière continue qui répondront elles aussi de manière continue ce qui réduira le bruit de fond. D'autre part, avec une telle lampe, il sera possible de focaliser tout le faisceau et non une partie comme c'était le cas pour le laser à azote. En effet, celui-ci délivre un faisceau de forme rectangulaire qu'il a fallu transformer par un diaphragme et une lentille en faisceau convergent de forme circulaire pour pouvoir entrer dans l'extrémité de la fibre optique conductrice de l'excitation (cf. figure (III).2.).

IV.122. Fibres optiques

Adaptées au système utilisé jusqu'alors, il sera peut être judicieux, si l'un des paramètres est modifié, de reconsidérer la configuration du montage. Eventuellement, le diamètre des fibres réceptrices peut être augmenté (raisonnablement jusqu'à 1 mm de diamètre) pour récupérer plus d'émission de fluorescence, mais il ne faut pas perdre de vue que plus le champ est élargi, moins la mesure est locale.

IV.123. Analyse de la fluorescence

a) Augmentation de la sensibilité de l'appareil

Le spectrofluorimètre Jobin-Yvon utilisé en tant qu'analyseur de l'émission de fluorescence s'est révélé inefficace. Par contre, le spectrofluorimètre SPEX a montré plus de sensibilité. Ainsi, un monochromateur relié à un photomultiplicateur puissant devrait-il permettre de détecter avec plus de précision le signal d'émission de fluorescence.

b) Changement de configuration

Sutherland et al. (1984) dans leur étude concernant la réaction de couplage anticorps-antigène à l'interface verre-liquide ont construit leur système de détection de manière différente. En effet, ils ont réalisé l'étude de l'émission de fluorescence des anticorps marqués par récupération des ondes évanescentes amplifiées.

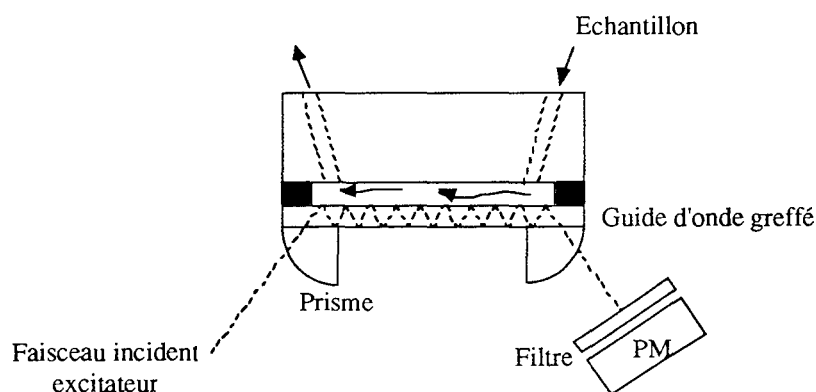


Figure (IV).2.
Analyse de la fluorescence des ondes évanescentes,
montage décrit et utilisé par Sutherland et al., 1984.

Un tel système pourrait être envisagé, à condition de ne pas récupérer la fluorescence de toutes les molécules greffées le long de la surface, car il n'y aurait plus, alors, de mesure locale.

IV.2. PERSPECTIVES

IV.21. Environnement du capteur

IV.211. Dans l'air

Ce type de capteur peut être utilisé pour doser l'oxygène de l'air. C'est ce qu'ont exposé Wolfbeis et al. (1984) dans leur étude concernant la détermination de la pression partielle en oxygène dans un courant gazeux (figure (III).3).

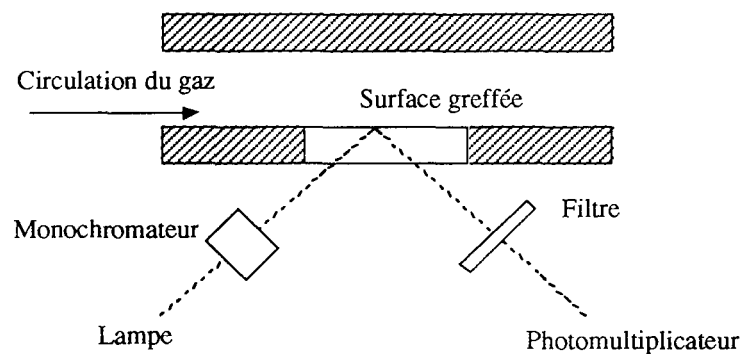


Figure (IV).3.
Détermination de la pression partielle en oxygène
dans un courant gazeux.

Nous avons vu (cf. § II.33. et figure (II).9.) que l'APB greffé sur la plaque fluoresçait dans l'air. Ainsi, notre capteur peut aussi être utilisé pour détecter et mesurer l'oxygène dans un milieu gazeux.

IV.212. Dans un milieu organique

La figure (IV).4. regroupe les spectres d'émission de fluorescence de la même plaque greffée dans différents milieux organiques ainsi que les longueurs d'onde des pics d'intensité maximale. Nous pouvons donc constater qu'il est possible d'utiliser le capteur dans différents environnements. Bien sûr, il reste à vérifier que le capteur reste sensible à

l'oxygène dissous mais aussi que le milieu ne détruit pas le greffage de façon trop importante.

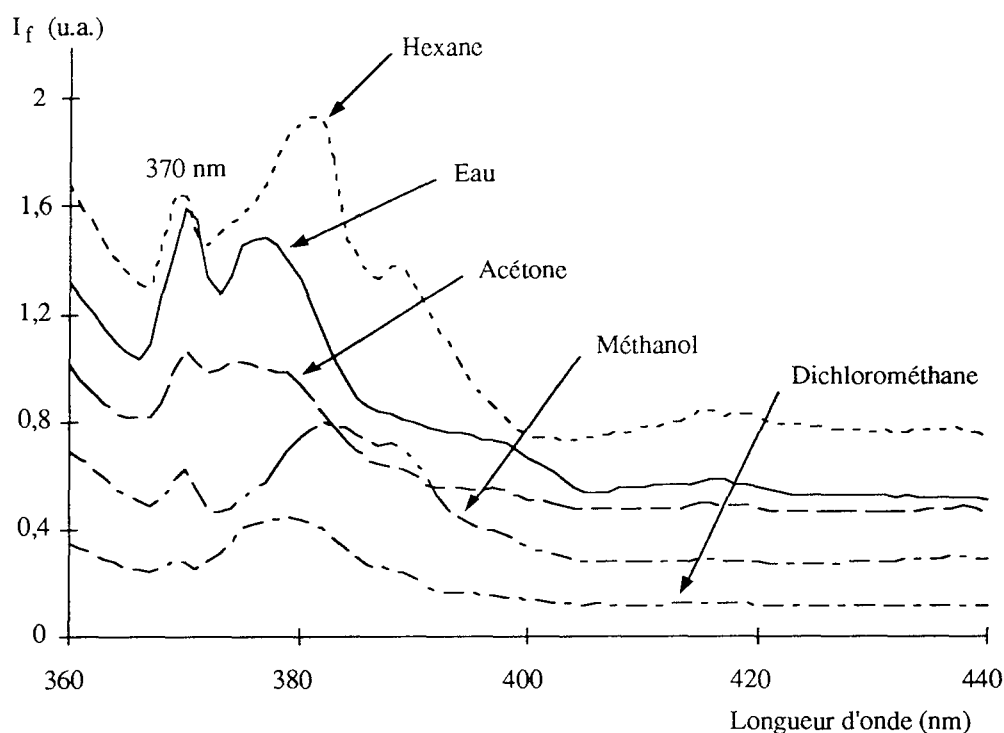


Figure (IV).4.

Spectres d'émission de fluorescence d'une même plaque dans différents solvants :
Eau $\lambda_{em} = 377$ nm ; Hexane $\lambda_{em} = 381$ nm ; Acétone $\lambda_{em} = 375$ nm ;
Méthanol $\lambda_{em} = 382$ nm ; Dichlorométhane $\lambda_{em} = 379$ nm.

Rappelons que la liaison fluorophore-surface supporte mal un environnement basique (c'est en effet en milieu NaOH de concentration 1 M que les surfaces sont dégreffées). Il faut donc proscrire les milieux agressifs.

IV.22. Détection des bulles de gaz

Lors des tests effectués pour mettre au point le capteur, nous avons constaté que celui-ci était sensible à la présence de bulles de gaz dans le milieu. La figure (IV).5. est une partie d'un spectre de fluorescence obtenu pendant le bullage de l'azote avec l'arrivée du gaz placée sous le capteur. Nous pouvons distinguer facilement les pics dus au passage des bulles de gaz.

En fait, une bulle de gaz passant devant la surface, et donc devant le faisceau excitateur, va produire un environnement différent pour la transmission de la lumière qui va se traduire par une perturbation du signal récupéré. Ce sont les pics que l'on observe sur l'enregistrement.

Ce type d'observation peut être très intéressant lorsque le capteur est utilisé en milieu biphasique. Les résultats permettraient d'obtenir d'une part, la concentration en oxygène dissous et, d'autre part, des renseignements concernant le bullage. Ainsi, nous pouvons, par exemple, envisager d'effectuer des mesures dans des colonnes à bulles, en haut et en bas de la colonne. Ce qui nous informerait simultanément sur la concentration en oxygène liquide et en oxygène gazeux en fonction du temps.

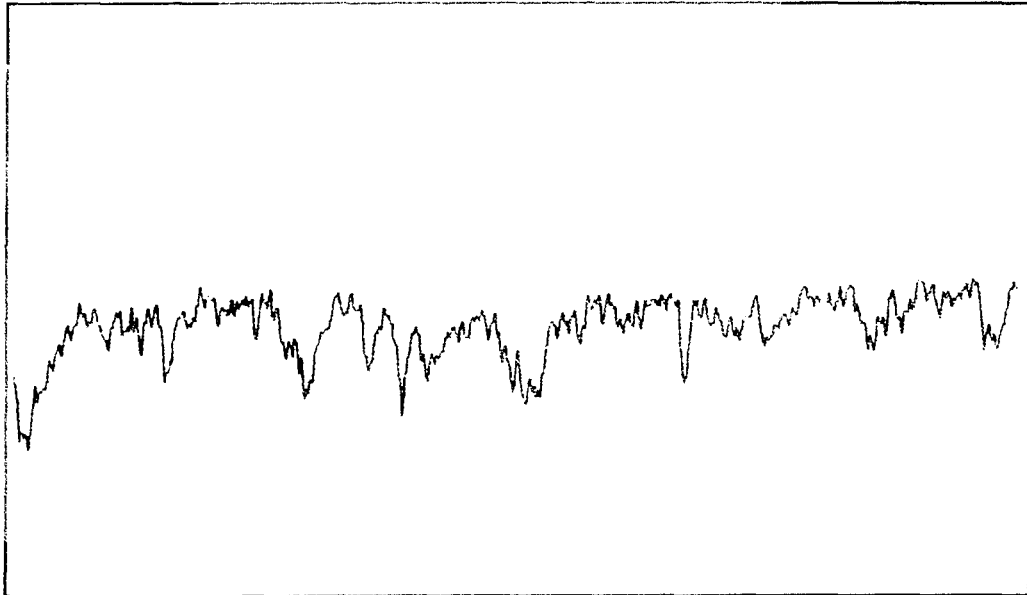


Figure (IV).5.
Effet des bulles de gaz passant devant le capteur.

IV.3. CONCLUSION

Le travail de recherche développé dans ce qui précède avait pour but la construction d'un outil de mesure des phénomènes de transfert à l'interface gaz-liquide plus rapide que les capteurs utilisés jusqu'alors. Afin que la réponse soit instantanée, nous avons choisi de mettre à profit l'inhibition de fluorescence de l'acide 4-(1-pyrényl)butyrique par l'oxygène dissous dans l'eau.

Au cours de notre étude, nous avons donc cherché une méthode de fixation du fluorophore qui soit stable sous l'eau. Le greffage chimique sur une surface en silice, transparente aux rayons lumineux, destinée à notre capteur s'est révélé le plus favorable. La première partie de notre travail nous a permis de dégager un mode de modification de la surface particulièrement intéressant. En effet, la qualité de la couverture de la surface, tant au niveau de son homogénéité que de sa stabilité dépend de la présence ou non d'eau lors de l'étape de silanisation. Nous avons montré, d'une part à l'aide des techniques d'analyse de surfaces disponibles au laboratoire (microscopie à champ proche - analyse qualitative) et d'autre part par fluorimétrie (analyse quantitative), que la meilleure façon de greffer est d'effectuer une silanisation en présence d'eau uniquement sur la surface (développement des chaînes polymère le long de celle-ci qui engendre une polymérisation horizontale). L'étude de la stabilité sous un courant d'eau a confirmé notre choix. Dans cette partie, nous avons mis en évidence la possibilité d'adsorption du fluorophore sur la surface par une liaison autre que chimique (liaison faible de type Van der Waals). La cinétique de la désorption dans du DMF a été établie. Ainsi, ce phénomène suit une cinétique du premier ordre avec, cependant, une première partie linéaire (cinétique d'ordre 0) en ce qui concerne les surfaces silanisées avec une polymérisation horizontale. L'hypothèse d'une adsorption en plusieurs couches a été avancée.

Compte tenu du choix du mode de modification (silanisation avec polymérisation horizontale), la surface obtenue avait la principale qualité requise, à savoir une stabilité sous un courant d'eau. La deuxième partie s'est axée sur la mise en œuvre du capteur.

Ainsi, avons-nous mis au point un système capable de mesurer des fluctuations de la concentration en oxygène dissous reliées aux fluctuations de l'intensité de fluorescence de

l'APB. Ceci nous a conduit à établir la droite de Stern-Volmer ($1/I = f([O_2])$) dans le cas d'un milieu statique et dans celui d'un milieu dynamique. Le coefficient directeur K_S de cette droite peut être relié au coefficient de transfert volumique du gaz vers le liquide (k_{La}).

Nous avons donc montré que la détermination du k_{La} , coefficient intervenant dans **l'étude des phénomènes de transferts pariétaux** était possible en utilisant **la photophysique**.

Enfin, ce capteur devait répondre à plusieurs critères :

- la zone de mesure de l'intensité de la fluorescence devait être optimisée pour permettre une localisation très précise du phénomène d'inhibition par l'oxygène sur la surface et se placer éventuellement à l'échelle moléculaire,
- la molécule devait être au contact de l'eau (à quelques Angström de la surface) et non pas incluse dans une matrice polymère (la constante de diffusion dépendrait déjà de la diffusion dans le polymère),
- la source d'excitation et le système d'analyse, ainsi que la partie active du capteur devaient être transportables facilement.

L'ensemble de ces critères a limité la sensibilité de notre capteur et nous a conduit à envisager les améliorations à apporter.

Les avantages d'un tel capteur, tels que la possibilité de réaliser des mesures en milieu gazeux (dans l'air) ou organique (solvants divers), ainsi que la détection des bulles, orientent les recherches vers d'autres horizons. Notons également que la molécule fluorescente choisie n'est pas sensible qu'à la présence d'oxygène mais aussi à d'autres composés comme par exemple les halogénures.

ANNEXE I

Greffages et utilisations des surfaces greffées selon les descriptions de la littérature

Le tableau (AI).1. donne un aperçu non exhaustif des différentes possibilités offertes par le choix de la surface, du silane, du mode de silanisation, du greffage et de la molécule fonctionnelle.

Seuls les articles traitant du greffage dans sa totalité (ajout de la molécule fonctionnelle compris) ont été notés. Cependant, il existe plusieurs autres utilisations de surfaces uniquement silanisées ou de molécules fonctionnelles piégées dans des membranes.

Les abréviations utilisées pour les silanes ainsi que les parties réactives et fonctionnelles sont données dans le tableau (AI).2.

Tableau (AI).1.
Possibilités offertes par le greffage.

Type de surface	Silanisation - solvant - conditions	Silane	Fonctionnalisation - solvant - conditions	Molécule	Utilisation	Auteurs
Lames de verre (11 x 44 mm) Fibres optiques (Ø 550 µm)	- toluène - atmosphère inerte	MDS, MTS, ADS, ATS, GOPS	- diméthylformamide - ambiante	GMBS + anticorps	Immunoanalyse	Bhatia et al., 1989
Fibres optiques (Ø 1000 µm)	- toluène - reflux sous azote	DMOS	- méthanol - ambiante	3-octylriboflavine	Capteur biologique basé sur l'inhibition de fluorescence	Ogasawara et al., 1992
Fibres optiques (Ø 650 µm)	- solution aqueuse - 90°C, pH=3	GOPS	- solution aqueuse - 4°C	IgG de lapin marqués à la fluorescéine	Capteur basé sur le principe de la compétition de fluorescence	Tromberg et al., 1987
Verre poreux contrôlé (CPG 170 Å) fixé en couche fine sur une lame 20 x 20 mm	- toluène (0,2 % eau) - reflux	APTES	- toluène + carbodiimide - ambiante	APB	Capteur à oxygène basé sur l'inhibition de fluorescence	Wolfbeis et al., 1984
Lames de microscope (75 x 25 x 1 mm) Fibres optiques (Ø 600 µm)	- solution aqueuse milieu acide - 80°C - "post-curing" 100 et 120°C	APTES	- tampon phosphate - ambiante	glutaraldéhyde + anticorps	Capteur pour l'étude du couplage anticorps/antigène à l'interface solide-liquide	Sutherland et al., 1984
Lames de microscope 20 x 20 mm	- toluène distillé et toluène saturé en eau - reflux - chlorure de tosyle	APTES	- solution aqueuse + EDC - ambiante	molécule fluorescente	Capteur pour halogénures et pseudo-halogénures basé sur l'inhibition de fluorescence	Urbano et al., 1984
Lames de silice structure en feuillet	- dichlorométhane - immersion courte	DMS	- tampon phosphate - ambiante	albumine de bovin (antigène)	Etude cinétique du couplage antigène/anticorps	Nygren et Stenberg, 1985
Structure en feuillet dopée au phosphore (10 x 10 mm)	- dépôt par vapeur	AAprop	- tampon phosphate - ambiante	Antigène	Etude de l'adsorption de protéines sur des surfaces modifiées	Jönsson et al., 1985 _c

Type de surface	Silanisation - solvant - conditions	Silane	Fonctionnalisation - solvant - conditions	Molécule	Utilisation	Auteurs
Gel de silice (\varnothing pores 23 nm 320 m ² /g)	- acétone - "post-curing" 45°C	APTES	- solution aqueuse - 8/10°C	glutaraldéhyde + L-lysine-2- monooxygénase	Capteur pour la détermination de la L-lysine en flux continu, basé sur la consommation d'oxygène	Simonian et al., 1991
Lames de microscope en verre (25 mm x 10 mm)	- tube scellé, 90°C	APTES	- triéthylamine et chloroforme - chaud	CICOPhNO ₂ puis couplage avec PhN(CH ₃) ₂	Etude du greffage par équilibre acide/base de la molécule greffée	Mimms et al., 1977
Verre poreux contrôlé (CPG 10- 170 Å) fixé en couche fine sur une lame 25 x 25 mm	- toluène - reflux	APTES + HPTS APTES	Réaction de couplage avant silanisation	 HCC + EDC	Capteurs pour la mesure de pH	Offenbacher et al., 1986
Lames de quartz (500 mm ² x 1 mm)	- aqueux pH=7 - 90°C	GOPS	- acétone + pyridine - 0°C	Chlorure de tréstyle puis couplage anticorps	Capteur immunobiologique basé sur la fluorescence d'un anticorps	Bright et al., 1990
Substrat semi- conducteur Si/SiO ₂	- isopentane - sous vide, - 30°C - "post-curing" 70°C sous N ₂	ADS	- aqueux - ambiante	glutaraldéhyde + IgG	Détection de toxine par mesure de capacitance	Billard et al., 1991
Même surface que ci- dessus	- isopentane - sous vide, - 30°C - "post-curing" 140°C	ADS	- aqueux - ambiante	glutaraldéhyde + anticorps	Même utilisation	Bataillard et al., 1988
Fibres optiques (\varnothing 600 μ m)	- aqueux pH = 3 - 90°C - "post-curing" 105°C	GOPS	- 4°C	IgG	Dosages immunobiologiques	Petrea et al., 1988
Structure en feuillets (5 x 5 mm)	- toluène anhydre - 100°C	APTES	- aqueux - ambiante	glutaraldéhyde + IgG	Capteur immunobiologique	Zaitsev et al., 1991
Fibres optiques (\varnothing 600 μ m)	- toluène - reflux	GOPS	- DMF, sous N ₂ - 60°C	β -cyclodextrine	Capteur immunobiologique	Alarie et Vo Dinh, 1991

Type de surface	Silanisation - solvant - conditions	Silane	Fonctionnalisation - solvant - conditions	Molécule	Utilisation	Auteurs
Capillaires en silice fondue (Ø 50 µm x 1 m)	- réaction de Grignard dans du THF - chlorure de thionyle	<i>bromure de vinyl magnésium</i>	- tétraméthyléthylène diamine + eau - ambiante	acrylamide	Séparation de protéines par électrophorèse	Cobb et al., 1990
Lames de silice (24 x 9,55 x 1 mm)	- éthanol (pour APTES) et toluène (pour DMS) - ambiante - "post-curing" 80°C	APTES DMS	adsorption physique dans une solution aqueuse ou immobilisation covalente par le glutaraldéhyde	anticorps	Capteur biologique basé sur la radioanalyse	Lin et al., 1988
Structure lamellaire de silice dopée au bore (10 x 25 x 0,2 mm)	- DMS : trichloroéthylène, xylène et APTES : toluène sec distillé - ambiante	APTES DMS	- tampon phosphate - ambiante	glutaraldéhyde + IgG	Etude de l'adsorption de protéines sur des surfaces silanisées et de l'action d'un lavage par un détergent	Vandenberg et al., 1991
Fibres optiques (1 x 60 mm)	- éthanol - 90°C	APTES	- tampon phosphate - ambiante	glutaraldéhyde + toxine anti-botulinum	Capteur biologique pour la détection de la toxine botulinum basé sur la fluorescence de la FITC	Kumar et al., 1994
Lames de silice fondue (25 x 50 x 2 mm) et fibres optiques (Ø 600 µm) recouvertes d'un film sol-gel	- solution aqueuse - 90°C	GOPS	- tampon phosphate - 4°C	protéine + antifuorescéine	Etude d'interfaces hétérogènes par ondes évanescentes	Lundgren et al., 1994
Fibres optiques (Ø 200-240 µm)	- aqueux - pH = 3,5 (MPS) pH = 3,75 (APTES)	MPS APTES	- tampon phosphate - ambiante	glutaraldéhyde + pénicillinase	Capteur pour la détection de la pénicilline	Kulp et al., 1987
Fibres optiques (Ø 1mm)	- solution aqueuse - 90°C, pH = 3	GOPS, APTES	- tampon phosphate - 4°C	glutaraldéhyde + IgG de lapin	Etude comparative de différentes modifications pour l'obtention de capteurs biologiques	Claudon et al., 1991 Williamson et al., 1989

Type de surface	Silanisation - solvant - conditions	Silane	Fonctionnalisation - solvant - conditions	Molécule	Utilisation	Auteurs
Tamis moléculaire 350 m ² /g	- éthanol - "post-curing" 110°C	APTES	- éthanol - ambiante	glutaraldéhyde + luminol	Détermination de peroxyde d'hydrogène dans des flux	Rao et al., 1992
Lames de verre de microscope 75,5 x 26 x 1 mm	- trichloroéthylène - immersion courte	DMS	- tampon phosphate - ambiante	albumine de bovin IgG marquée à la FITC	Capteur biologique basé sur la fluorescence de la FITC par ondes évanescentes	Zhou et al., 1991
Verre poreux	- toluène - reflux	APTES	- acide acétique, nitrite de sodium - ambiante	N,N-diméthylaniline	Indicateur de pH	Harper, 1975
Surfaces Si/SiO ₂ (aucune indication)	- eau distillée (pH=7) - 80°C	APTES	- solution aqueuse - ambiante	glutaraldéhyde + protéine	Etude de l'adsorption de protéines et étude de l'efficacité de lavages après immobilisation	Williams et Blanch, 1994

Anexe I : greffages et utilisations des surfaces greffées selon les descriptions de la littérature

Tableau (AI).2.
Abréviations utilisées pour les silanes : X_n-SiR_{4-n} .

	Nom	Partie réactive		Partie fonctionnelle R_1, R_2, R_3
		X	n	
AAprop	N-(2-aminoéthyl-3-aminopropyl) triméthoxysilane	-O-CH ₃	3	NH ₂ -(CH ₂) ₂ -NH(CH ₂) ₃ -
ADS	4-aminobutyldiméthylméthoxysilane	-O-CH ₃	1	$R_1 : -(CH_2)_4-NH_2$ $R_2 = R_3 : -CH_3$
APTES	3-aminopropyltriéthoxysilane	-O-CH ₂ -CH ₃	3	-(CH ₂) ₃ -NH ₂
ATS	4-aminobutyltriéthoxysilane	-O-CH ₂ -CH ₃	3	-(CH ₂) ₄ -NH ₂
DMS	dichlorodiméthylsilane	-Cl	2	-CH ₃
DMOS	chlorodiméthyl octadécylsilane	-Cl	1	$R_1 : -(CH_2)_{17}-CH_3$ $R_2 = R_3 : -CH_3$
GOPS	3-glycidoxypropyltriméthoxysilane	-O-CH ₃	3	-(CH ₂) ₃ -O-CH ₂ -CH-CH ₂ O
MDS	mercaptométhyl diméthyléthoxysilane	-O-CH ₂ -CH ₃	1	$R_1 = R_2 : -CH_3$ $R_3 : -CH_2-SH$
MPS	méthacryloyloxypropyltriméthoxysilane	-O-CH ₃	3	-(CH ₂) ₃ -O-CO-(CH ₃)C=CH ₂
MTS	mercaptopropyltriméthoxysilane	-O-CH ₃	3	-(CH ₂) ₃ -SH
ODDAS	octadécyl diméthyl (diméthylamino) silane	-N(CH ₃) ₂	1	$R_1 = R_2 : CH_3$ $R_3 : -(CH_2)_{17}-CH_3$
OTS	octadécyl trichlorosilane	-Cl	3	-(CH ₂) ₁₇ -CH ₃
TMS	triméthyl chlorosilane	-Cl	1	-CH ₃

ANNEXE II

Techniques d'analyse de surfaces

La plupart des particules peuvent exister aussi bien sous forme excitée que sous forme émise. Nous avons donc regroupé les techniques d'analyse dans un tableau (tableau (AII).1) dans lequel les colonnes se réfèrent à la nature de la particule excitée et les lignes à la nature de la particule émise. Les abréviations des techniques d'analyse de surface sont celles provenant du nom anglais.

Quelques techniques, cependant, ne peuvent être classées de par la nature de la particule excitatrice puisqu'elles reposent sur l'application d'un champ électrique ou sur une force mécanique. Elles sont regroupées dans le tableau (AII).2.

Tableau (AII).1.
Techniques d'analyse utilisant des particules.

Emission	Excitation			
	Photons hv	Electrons e ⁻	Ions n ⁺ , n ⁻	Eléments neutres n ⁰
hv	Ellipsométrie			
e ⁻	XPS XAES	AES		
n ⁺ , n ⁻			SIMS ISS	FABMS

Tableau (AII).2.
Techniques d'analyse utilisant un champ électrique ou une force mécanique.

Emission	Excitation	
	Champ électrique fort F	Force mécanique
e ⁻ (déplacement)	STM	AFM

AII.1. Ellipsométrie

Principe : la surface est balayée par un faisceau lumineux de longueur d'onde connue. La lumière est réfléchiée par la surface et la mesure du changement de l'angle de polarisation de ce faisceau réfléchi en fonction de la longueur d'onde permet d'obtenir des renseignements sur l'état de la surface.

Cette méthode est particulièrement sensible à la présence de films minces à la surface et permet d'obtenir l'indice optique et l'épaisseur du film.

AII.2. XPS - Spectroscopie photoélectronique à rayons X

Principe : la surface est irradiée avec des photons de rayons X. Lorsqu'un photon d'énergie $h\nu$, interagit avec un électron d'énergie E , l'énergie du photon est transférée à l'électron et un photoélectron est éjecté avec une énergie cinétique fonction de $h\nu$ et E .

La mesure de cette énergie cinétique permet une analyse élémentaire. De plus, si un changement a lieu dans l'environnement chimique, l'énergie cinétique est influencée, ce qui donne une indication chimique.

La technique XPS permet l'analyse de tous les éléments du tableau périodique, sauf l'hydrogène et l'hélium.

AII.3. AES et XAES - Spectroscopie d'électrons Auger

Le principe est identique à celui décrit en AII.2, seule la particule éjectée diffère de par son origine. En effet, lors du départ du photoélectron, il peut y avoir une réorganisation dans l'atome avec éjection d'un nouvel électron (électron Auger). C'est l'énergie cinétique de cet électron qui est mesurée.

AII.4. SIMS - Spectroscopie de masse d'ions secondaires

Principe : un faisceau d'ions positifs irradie la surface, conduisant à des interactions qui sont la cause d'émission d'une variété de particules secondaires, incluant des électrons secondaires, des électrons Auger, des photons, des neutrons, des neutrons excités, des ions positifs secondaires et des ions négatifs secondaires. La spectroscopie de masse d'ions secondaires est l'analyse des deux derniers types de particules éjectées. Les ions émis sont analysés dans un spectromètre de masse qui fournit une analyse élémentaire sous forme de pics caractéristiques des éléments de surface.

AII.5. ISS - Spectroscopie d'ions diffusés

Principe : un faisceau d'ions de gaz inertes (He^+ ou Ne^+) est envoyé sur la surface. L'énergie des ions diffusés ayant la même masse et la même charge que ceux de la source est mesurée.

A cause de leur grande affinité avec les électrons, les ions des gaz inertes ont une forte probabilité qu'une majorité d'entre eux soit neutralisée après la collision avec la surface (après deux collisions, le nombre d'ions originaux restant est alors négligeable). Donc, l'analyse des énergies des ions diffusés reflétera principalement les ions qui n'ont subi qu'une seule collision (*i.e.* celle qui a eu lieu avec la première couche d'atomes de la surface). De plus, si l'énergie et la masse des ions incidents ainsi que l'angle d'incidence sont fixés, alors le spectre d'énergie obtenu peut être directement converti en spectre de masse, ce qui permet une analyse élémentaire. Cependant, seule la masse des atomes de surface est impliquée et donc aucune indication de nature chimique ne peut être obtenue.

AII.6. FABMS - Spectroscopie de masse par bombardement d'atomes rapides

Principe : la technique est basée sur celle employée pour la spectroscopie de masse d'ions secondaires. Deux différences sont cependant à noter. La première est que l'échantillon est dissous dans une matrice liquide et la deuxième est qu'au lieu d'ions ce sont des atomes accélérés qui sont utilisés comme sources.

AII.7. STM - Microscopie à effet tunnel / AFM - Microscopie à force atomique

Principe : une pointe en métal est amenée si près d'une surface conductrice qu'un courant électronique à effet tunnel devient mesurable lorsque des tensions de l'ordre de 2 mV à 2 V sont appliquées. La pointe balaie la surface et le courant tunnel est enregistré. Deux possibilités d'utilisation sont offertes : soit la distance de la pointe à la surface varie pour que le courant mesuré reste constant (mode à courant constant), ou soit la distance est gardée constante tandis que les variations du courant sont enregistrées (mode à hauteur constante). Cette méthode requiert une surface conductrice et permet de visualiser la topographie et la distribution électronique à la surface.

La microscopie à force atomique est une technique identique à celle-ci. Elle permet, grâce à une pointe extrêmement fine et des moyens de détecter ses vibrations, de mesurer des interactions surface-pointe du type des forces de Van der Waals, ou des forces électroniques et magnétiques. Elle ne dépend pas de la nature conductrice de la surface car ce sont des forces mécaniques qui sont appliquées sur la pointe et l'information est ici purement topographique.

AII.8. PAS - Spectroscopie photoacoustique

Des processus photophysiques peuvent accompagner l'excitation de molécules à de hauts niveaux d'énergie. Lors des transitions non-radiatives qui s'ensuivent, l'énergie des molécules excitées est absorbée par l'environnement (molécules voisines). L'équilibre thermique est alors rétabli et la température du milieu environnant augmente. Ceci induit un changement dans le volume, appréciable dans le cas d'un gaz mais moins prononcé pour un liquide ou un solide.

Si des radiations modulées périodiquement sont utilisées, les changements périodiques dans le volume causent des variations de la pression et créent ainsi des ondes sonores qui peuvent être détectées (par un microphone par exemple). L'effet photoacoustique est basé sur ce principe.

AII.9. FT-IR - Spectroscopie infra-rouge à transformée de Fourier

Le principe de cette technique est basé sur l'interféromètre à deux faisceaux de Michelson. Une radiation IR est émise par une source thermique et est divisée en deux faisceaux identiques. Un des faisceaux est transmis au détecteur en passant par l'échantillon alors que l'autre, par l'intermédiaire de miroirs, est réfléchi et se recombine finalement avec le premier mais avec une différence de chemin optique. Cette différence est fonction de la position des miroirs. Le signal enregistré par le détecteur est donné sous forme d'une intensité mesurée en fonction de la position des miroirs. L'analyse s'effectue par comparaison avec un spectre de référence.

AII.10. TOF MS - Spectroscopie de masse à "temps-de-vol"

L'analyse de masse est basée sur le fait qu'après une accélération uniforme dans la source ionique, les ions légers arrivent plus tôt sur le détecteur que les ions lourds. Le détecteur est capable d'enregistrer la très petite différence de temps de vol. Ainsi, presque tous les ions qui quittent la source peuvent-ils être détectés.

ANNEXE III

Fluorescence de l'Acide 4-(1-Pyrényl)Butyrique

AIII.1. LA FLUORESCENCE

AIII.11. Concepts de base

L'état fondamental d'une molécule correspond normalement à son énergie électronique minimale. Dans ce cas, en général, la molécule est à l'état singulet S_0 .

Par absorption d'un photon, la molécule peut atteindre un niveau excité singulet S_n et, par conversions internes, revenir à l'état excité singulet S_1 .

Plusieurs modes de désactivation sont alors possibles pour que la molécule retourne à l'état fondamental S_0 :

- processus non radiatifs (conversions internes, conversions inter-systèmes, etc.),
- processus radiatifs (luminescence, etc.),
- processus photochimiques (photodissociation, photoaddition, photoréduction, photoréarrangement, photodimérisation, etc.).

Le diagramme de Jablonski illustre ces différents mécanismes de désactivation.

AIII.12. Désactivations radiatives : la fluorescence et la phosphorescence

La fluorescence résulte généralement de la désactivation de l'état électronique singulet S_1 en S_0 par émission d'un photon (transition entre états de même multiplicité). Dans ce cas, les transitions électroniques sont très rapides : la durée de vie réelle de la fluorescence est de 10^{-12} à 10^{-7} s. Le spectre d'émission de fluorescence apparaît à des longueurs d'onde légèrement supérieures à celles correspondant au spectre d'absorption.

Il existe plusieurs types d'analyses de la fluorescence, appliquées aux techniques fluorimétriques :

- l'intensité de fluorescence,
- la fluorescence résolue dans le temps,
- la polarisation de fluorescence, en excitation continue et/ou pulsée.

La phosphorescence correspond à la désactivation, par émission d'un photon, de l'état triplet, qui résulte d'une transition inter-systèmes entre S_1 et T_1 (transitions avec changement de multiplicité). La probabilité de cette transition étant faible, la durée de vie des états triplets est plus grande que celle des états singulets : entre 10^{-8} et 100 s. Les longueurs d'onde d'émission de phosphorescence sont plus grandes que celles de fluorescence, les niveaux énergétiques des états triplets étant inférieurs à ceux des états singulets.

AIII.13. La fluorescence : facteurs d'influence

Pour utiliser la fluorescence comme outil d'analyse, il est nécessaire de connaître les effets à la fois de la structure des molécules et de leur environnement sur les processus d'émission de la lumière.

AIII.131. Influence du solvant

L'étude des propriétés photophysiques de molécules fluorescentes est faite de façon majoritaire en solution.

Une molécule subit l'influence de ses voisins (solvant et soluté), aussi les paramètres photophysiques et les spectres d'absorption et d'émission sont-ils caractéristiques d'une molécule dans un solvant.

Pour beaucoup de molécules, l'état excité est plus polaire que l'état fondamental. Une augmentation de la polarité du solvant accroît la stabilité de l'état excité et entraîne une absorption et une fluorescence à plus basse énergie (donc des déplacements des longueurs d'onde vers le rouge, effet bathochrome).

AIII.132. Influence du pH

Pour des molécules présentant des propriétés acido-basiques, l'influence du pH sur la fluorescence se manifeste selon deux aspects. La fluorescence va dépendre d'une part de la (ou des) forme(s) acide(s) et/ou basique(s), dans la(es)quelle(s) se trouve la molécule à l'état fondamental, d'autre part des propriétés physiques et chimiques des espèces à l'état excité.

AIII.133. Influence de la viscosité

L'émission de fluorescence est sensible à la viscosité, puisque la viscosité modifie les propriétés de transport et les possibilités d'isomérisation et de rotation. La viscosité joue un rôle important, en particulier dans la formation d'excimères (inter et/ou intramoléculaires), la polarisation de fluorescence, la fluorescence de rotors moléculaires, etc.

AIII.134. Influence des solutés (inhibition de fluorescence)

La fluorescence d'une molécule peut être affectée par les interactions, non seulement avec le solvant, mais aussi avec les autres solutés.

L'interaction principale est celle faisant intervenir l'inhibition de fluorescence (ou "quenching" de fluorescence) c'est-à-dire l'arrêt de la fluorescence par une molécule étrangère.

L'inhibition de fluorescence peut avoir diverses origines comme :

- le transfert d'énergie électronique,
- le transfert d'électrons,
- l'existence d'une réaction chimique.

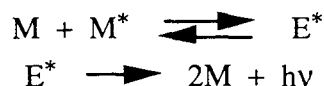
AIII.135. Influence de la température

La température joue un rôle sur tous les phénomènes précédents, mais aussi sur la plupart des constantes cinétiques.

Elle modifie aussi la répartition statistique de Maxwell-Boltzmann, entraînant un changement du rendement quantique de fluorescence, lequel diminue souvent lorsque la température augmente.

AIII.14. Excimères intermoléculaires

La formation d'excimères intermoléculaires correspond à l'association de deux fluorophores, par collision d'une molécule à l'état fondamental et d'une molécule à l'état excité. L'excimère n'existe qu'à l'état excité et peut se dissocier en donnant deux molécules à l'état fondamental, soit par émission de fluorescence, soit par un processus non radiatif.



Pour certaines molécules fluorescentes, comme par exemple le pyrène (ou l'APB), l'augmentation de la concentration provoque une diminution de l'intensité de fluorescence du monomère (forme structurée) et simultanément l'apparition d'une émission de fluorescence aux plus grandes longueurs d'onde (formation d'une large bande non structurée) correspondant à la formation d'excimères (figure (AIII).1).

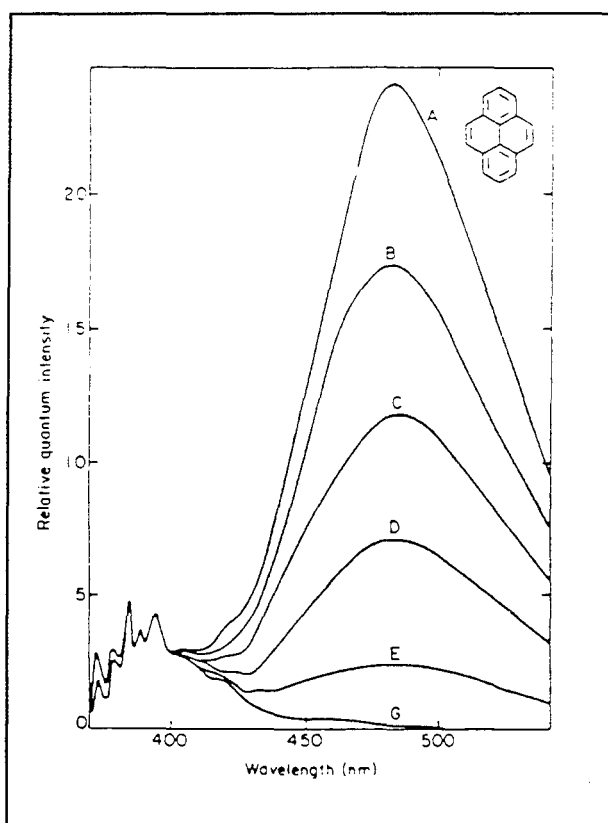


Figure (AIII).1.
Spectres de fluorescence du pyrène à différentes concentrations,
dans le cyclohexane, d'après Birks, 1970.
Les intensités sont normalisées.
A, 10^{-2} M ; B, $7,75 \cdot 10^{-3}$ M ; C, $5,5 \cdot 10^{-3}$ M ;
D, $3,25 \cdot 10^{-3}$ M ; E, 10^{-3} M ; G, 10^{-4} M.

AIII.15. Mesure de la fluorescence

La figure AIII.2 montre les principaux éléments d'un spectrofluorimètre. Ce sont, d'une part les monochromateurs, qui permettent de choisir les longueurs d'onde d'excitation et d'analyse, d'autre part les fentes qui limitent les largeurs de bande des deux faisceaux.

L'analyse de l'intensité de fluorescence n'est pas en ligne (l'émission étant en général isotrope), afin de réduire au mieux les erreurs causées par la diffusion de la lumière d'excitation vers le détecteur. La direction de mesure est souvent à 90° de celle de l'excitation ("Right Angle", angle droit).

L'appareil utilisé dans cette étude est un spectrofluorimètre SPEX 1681 Fluorolog (Jobin Yvon). Il possède un système d'auto-référence des mesures. Cependant pour plus de sûreté, avant chaque série de mesures, nous avons procédé à la mesure de la fluorescence d'une solution de fluorescéine, définissant ainsi notre propre référence.

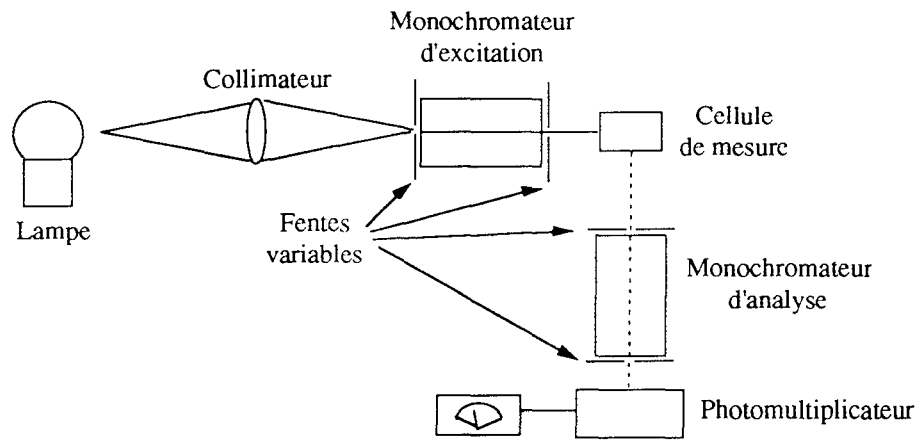


Figure AIII.2.
Schéma de principe d'un spectrofluorimètre.

AIII.2. L'ACIDE 4-(1-PYRENYL)BUTYRIQUE

Le pyrène et ses dérivés (pyrène 1-carboxaldéhyde, APB, etc.) sont couramment utilisés pour l'étude de milieux (membranes, polymères, etc.).

Les spectres d'excitation et d'émission de fluorescence de l'APB sont représentés sur la figure (AIII).3. Le spectre d'émission de fluorescence a une structure moins fine pour l'émission du monomère que celle du pyrène (cf. figure AIII.1). Elle est composée de trois pics principaux situés à 375, 395 et 417 nm.

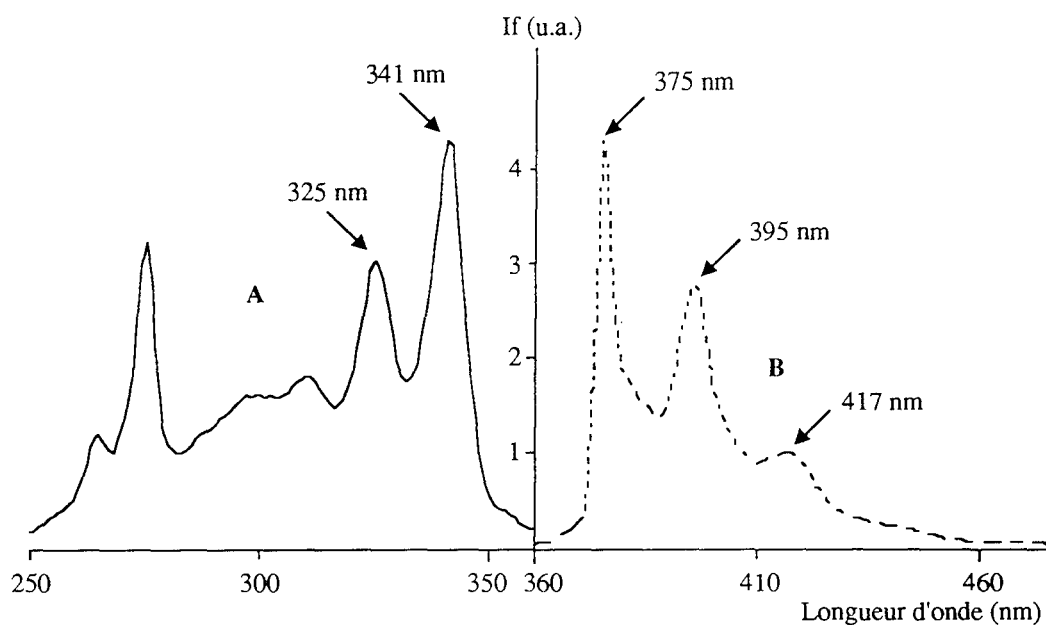


Figure (AIII).3.

Spectres de l'APB

A : spectre d'excitation pour une émission à 376 nm

B : spectre d'émission de fluorescence pour une excitation à 337 nm.

AIII.21. Courbe d'étalonnage APB/DMF

Afin de pouvoir relier l'intensité de fluorescence à une concentration en APB, il est nécessaire de réaliser une courbe d'étalonnage. Les valeurs données pour les intensités de fluorescence à 376 nm sont celles obtenues après correction par rapport à la solution de référence.

Une solution mère d'APB dans du DMF est préparée à partir de laquelle par dilutions successives, des solutions de concentrations différentes sont obtenues. L'étendue du domaine des concentrations a été déterminée en fonction des résultats de tests préalables.

Chacune des solutions est analysée par fluorimétrie dans des conditions identiques à celles qui seront utilisées par la suite (c'est-à-dire analyse de l'intensité de fluorescence à 376 nm pour une excitation à 337 nm avec des fentes à l'émission et à l'excitation de 0,5 nm). Le tableau (AIII).1 récapitule les données et résultats relatifs à ces analyses. La figure (AIII).4 représente la droite reliant les logarithmes des intensités et des concentrations. Le point représentant la concentration de la solution mère a été volontairement omis de la figure ainsi que des calculs qui ont permis de déterminer l'équation de la droite à cause de la présence d'excimères.

Tableau (AIII).1.
 Intensité de fluorescence de l'APB à 376 nm
 en fonction de la concentration dans du DMF.

Concentration C en APB (mol/L)	Intensité I du pic à 376 nm (cps)	log ₁₀ (C)	log ₁₀ (I)
10 ⁻⁴	2623300	-4	6,419
10 ⁻⁵	2156700	-5	6,334
10 ⁻⁶	289470	-6	5,461
10 ⁻⁷	35433	-7	4,549
10 ⁻⁸	9543	-8	3,979

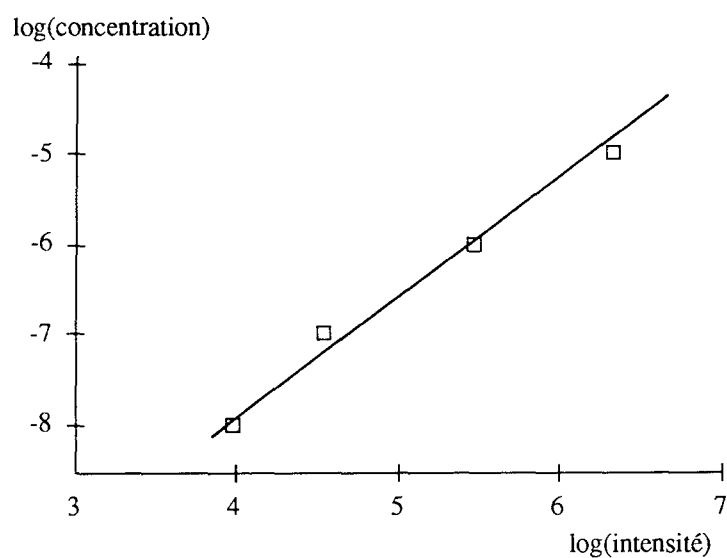


Figure (AIII).4.
 Droite d'étalonnage APB/DMF.

$$\log_{10} (C) = 1,242 \log_{10} (I) - 12,809$$

$$r^2 = 0,991$$

AIII.22. Courbe d'étalonnage APB/NaOH

Une solution mère d'APB dans NaOH 1 M est préparée, à partir de laquelle par dilutions successives, des solutions de concentrations différentes sont obtenues. L'étendue du domaine des concentrations a été déterminée en fonction des résultats de tests préalables.

Chacune des solutions est analysée par fluorimétrie dans des conditions identiques à celles qui seront utilisées par la suite (c'est-à-dire analyse de l'intensité de fluorescence à 376 nm pour une excitation à 337 nm avec des fentes à l'émission et à l'excitation de 0,5 nm). Le tableau (AIII).2 récapitule les données et résultats relatifs à ces analyses. La figure (AIII).5 représente la droite reliant les logarithmes des intensités et des concentrations.

Tableau (AIII).2.
Intensité de fluorescence de l'APB à 376 nm
en fonction de la concentration dans NaOH 1 M.

Concentration C en APB (mol/L)	Intensité I du pic à 376 nm (cps)	log ₁₀ (C)	log ₁₀ (I)
10 ⁻⁵	5719200	-5	6,757
10 ⁻⁶	977460	-6	5,991
10 ⁻⁷	109140	-7	5,038
10 ⁻⁸	14840	-8	4,171
10 ⁻⁸	4438	-9	3,647

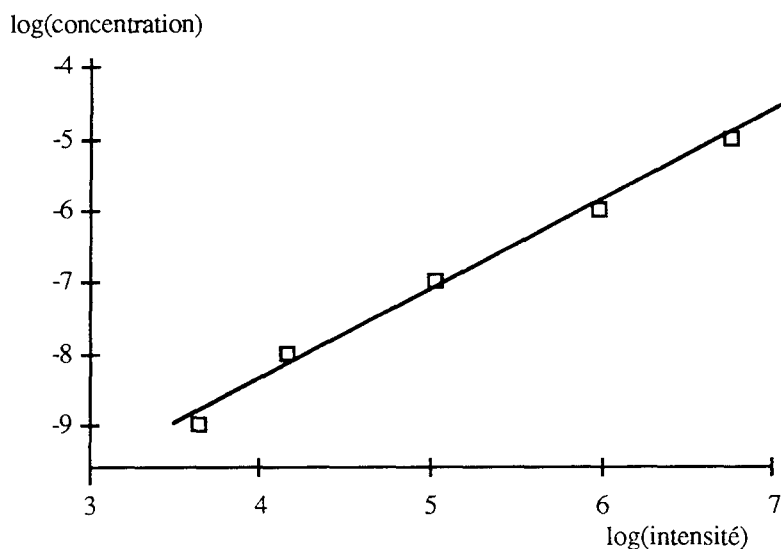


Figure (AIII).5.
Droite d'étalonnage APB/NaOH.

$$\log_{10} (C) = 1,234 \log_{10} (I) - 13,319$$

$$r^2 = 0,992$$

ANNEXE IV

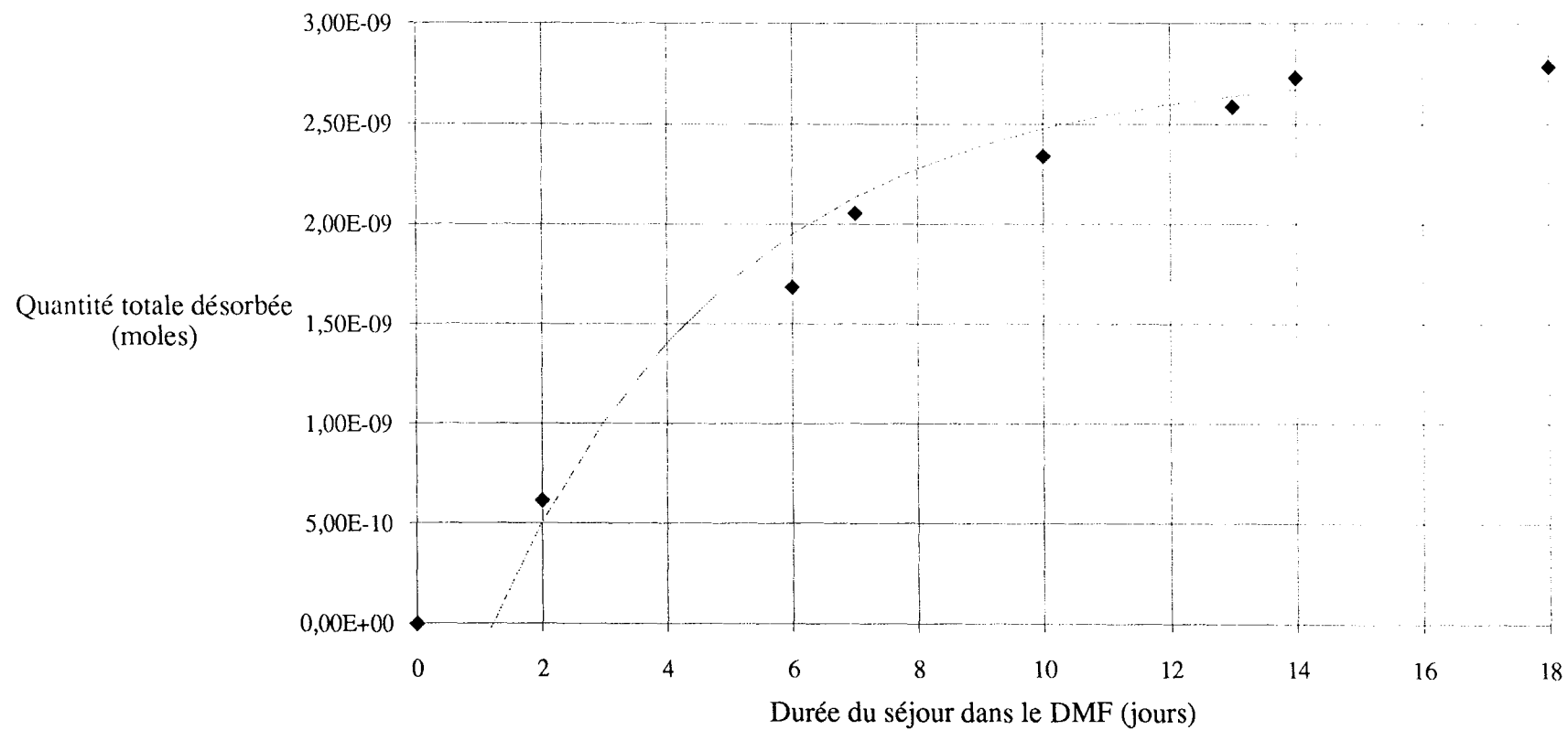
Résultats expérimentaux : Désorption de l'APB

Les résultats concernant l'étude du phénomène de désorption des molécules d'APB après greffage (cf. § II.432) sont présentés ici sous la forme d'une courbe donnant la quantité de molécules désorbées en fonction de la durée du séjour dans le DMF.

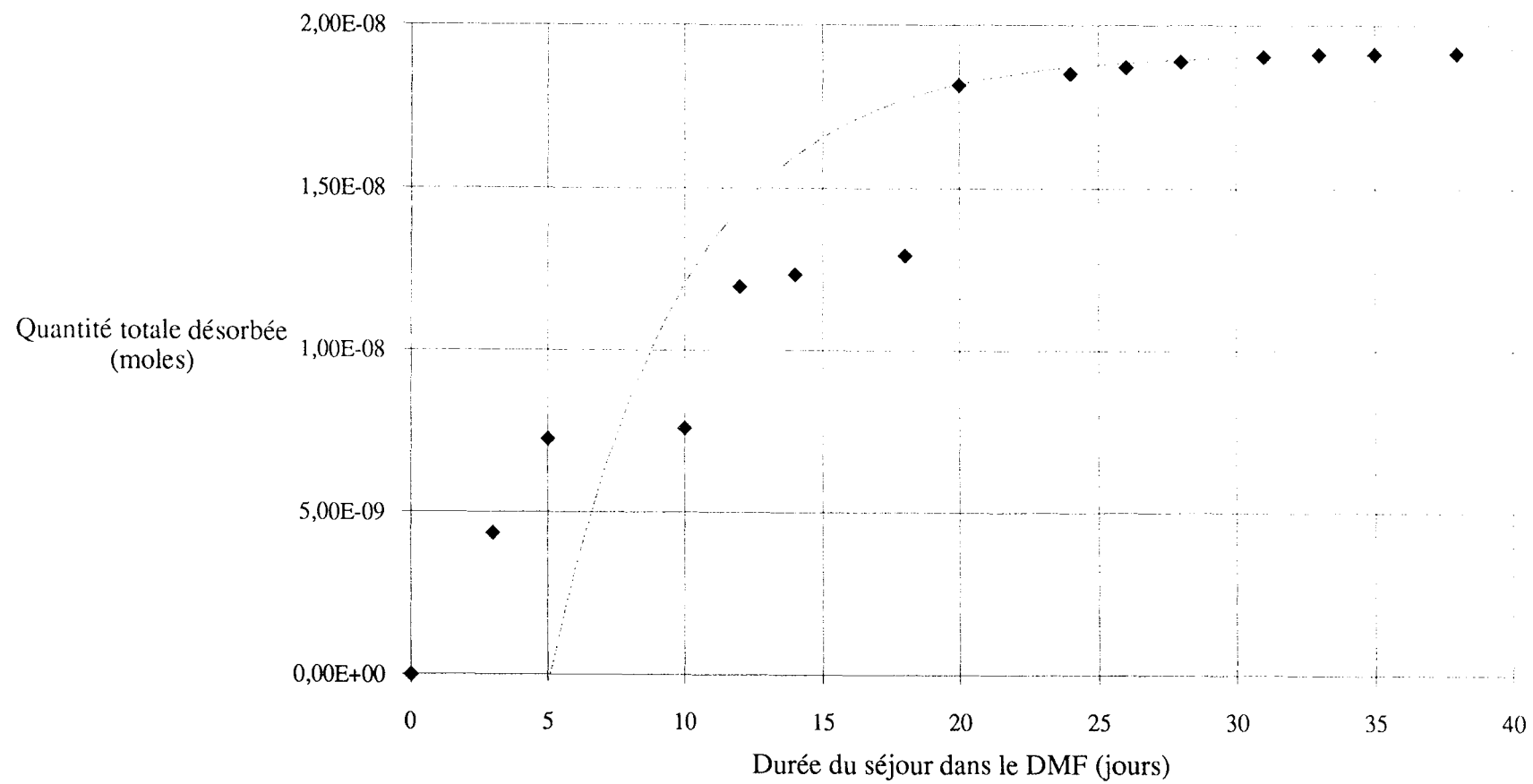
Les différentes plaques et leur type de silanisation sont donnés dans l'annexe V.

Les courbes théoriques calculées grâce à la modélisation du phénomène de désorption présentée dans le § II.52 sont également tracées.

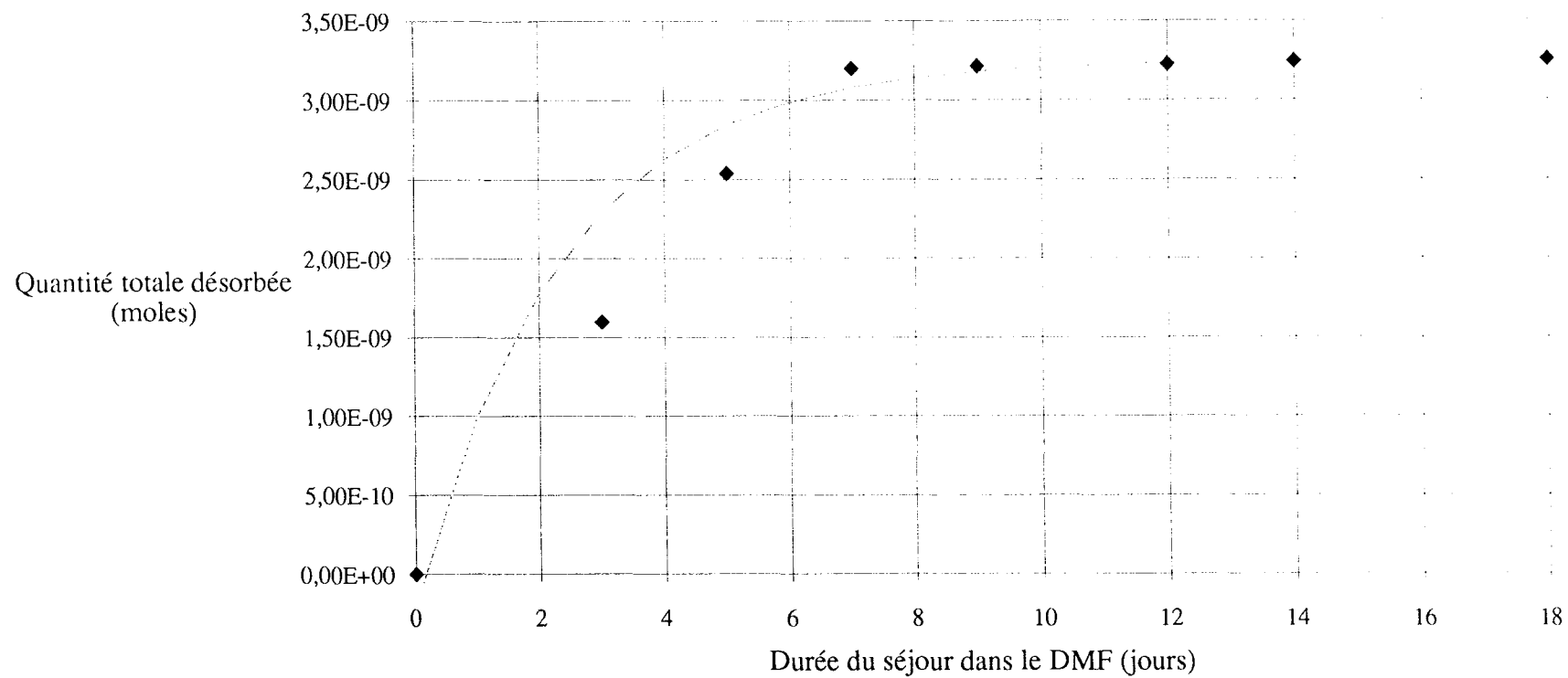
Courbe de désorption de la plaque 10 - v/a



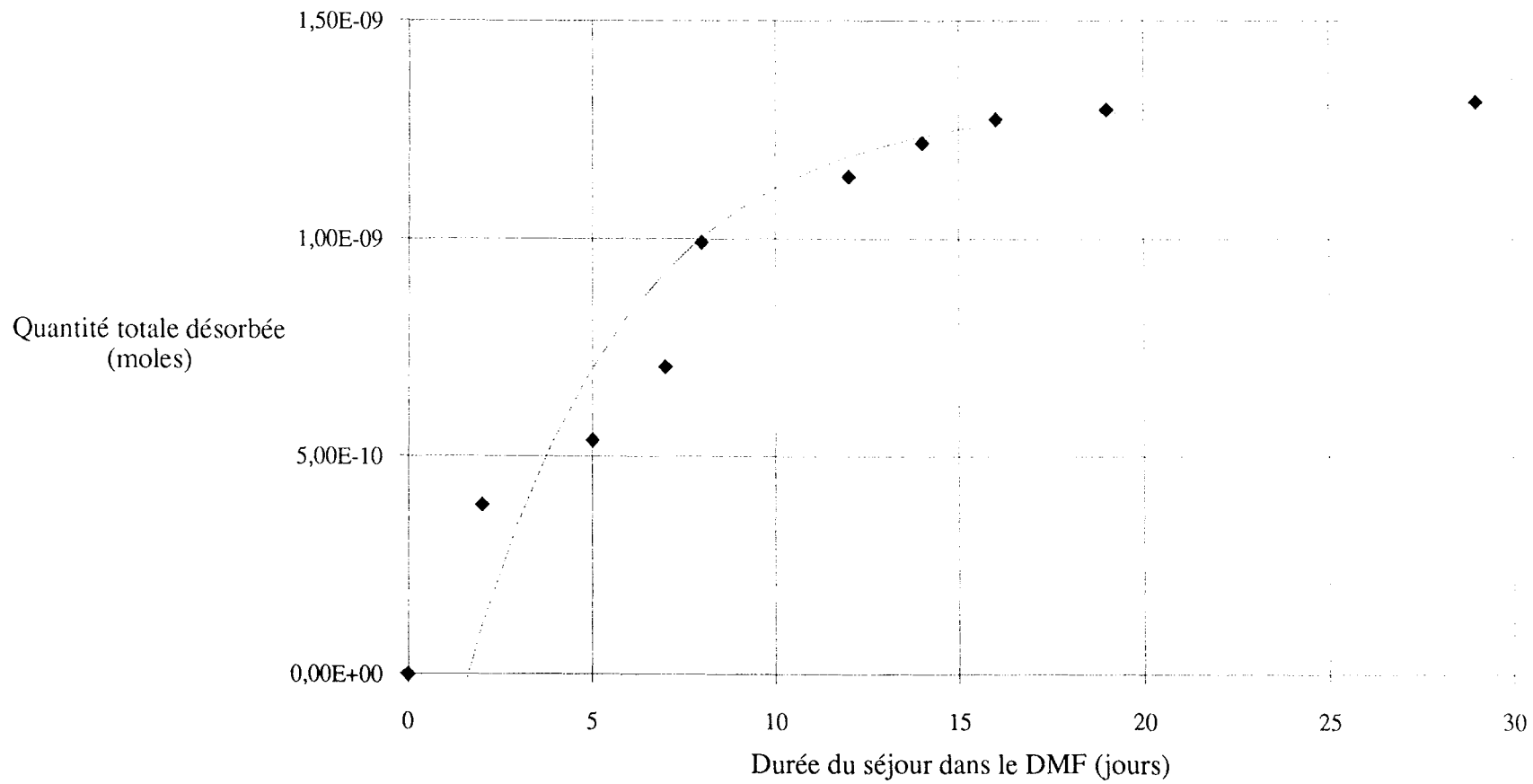
Courbe de désorption de la plaque 104 - s/a



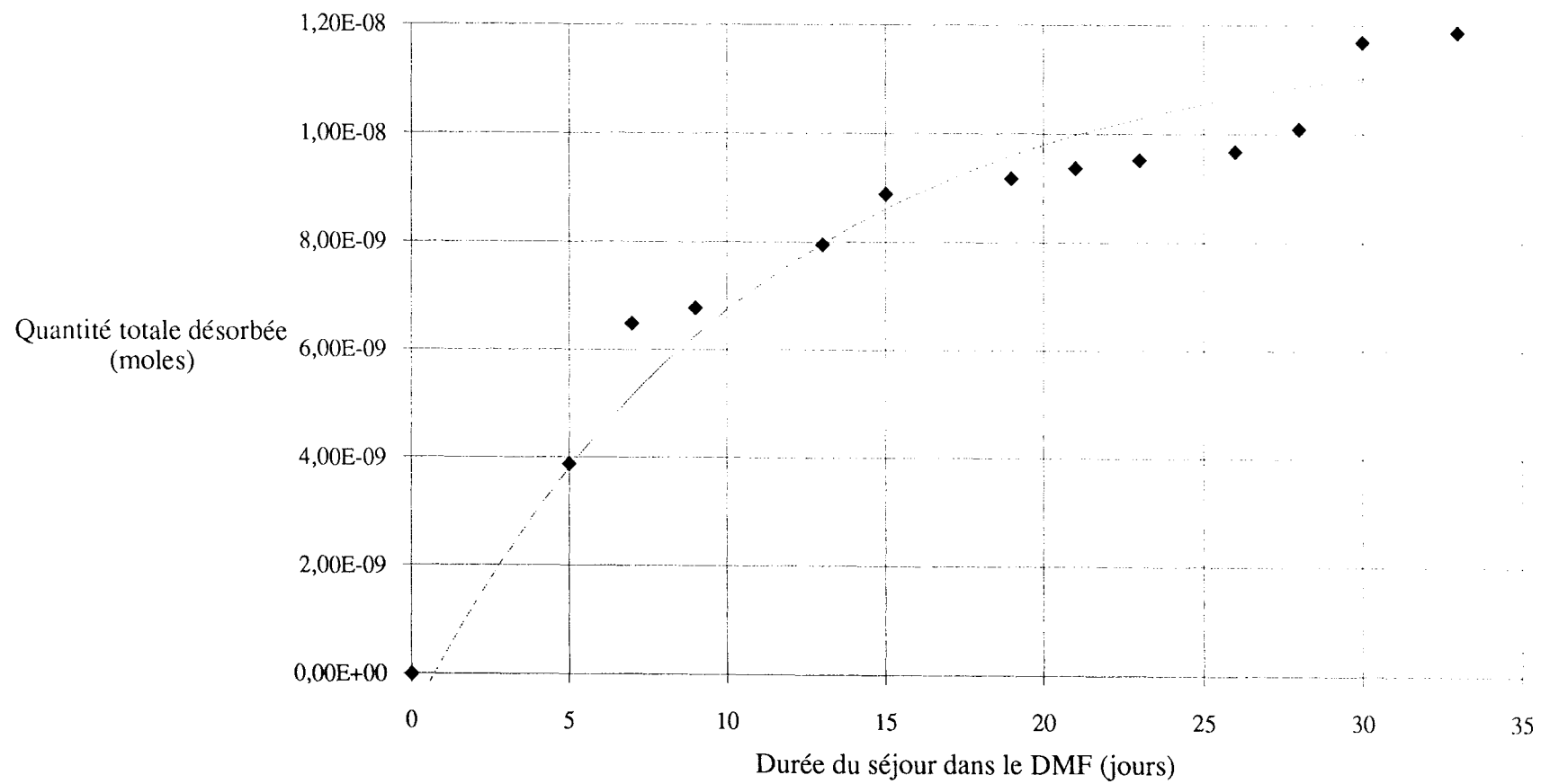
Courbe de désorption de la plaque 203 - s/a



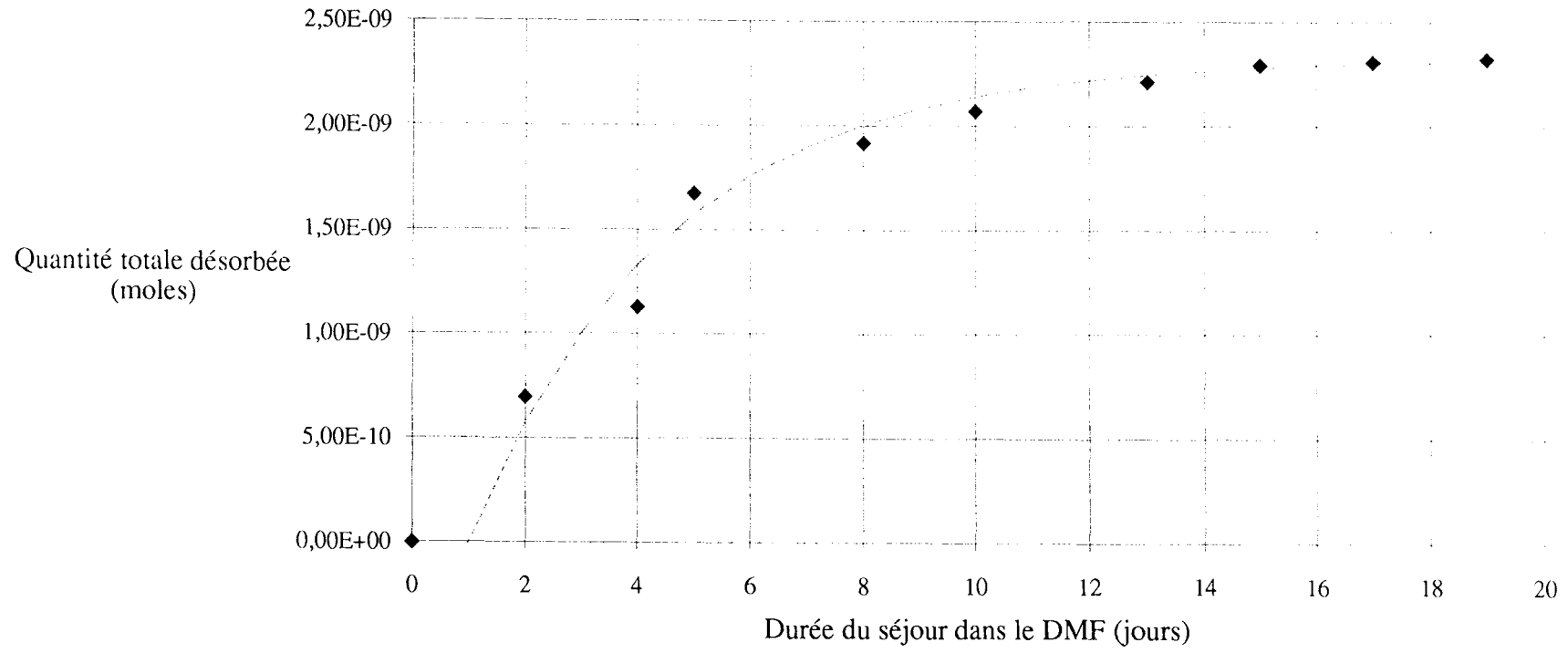
Courbe de désorption de la plaque 12 - v/e



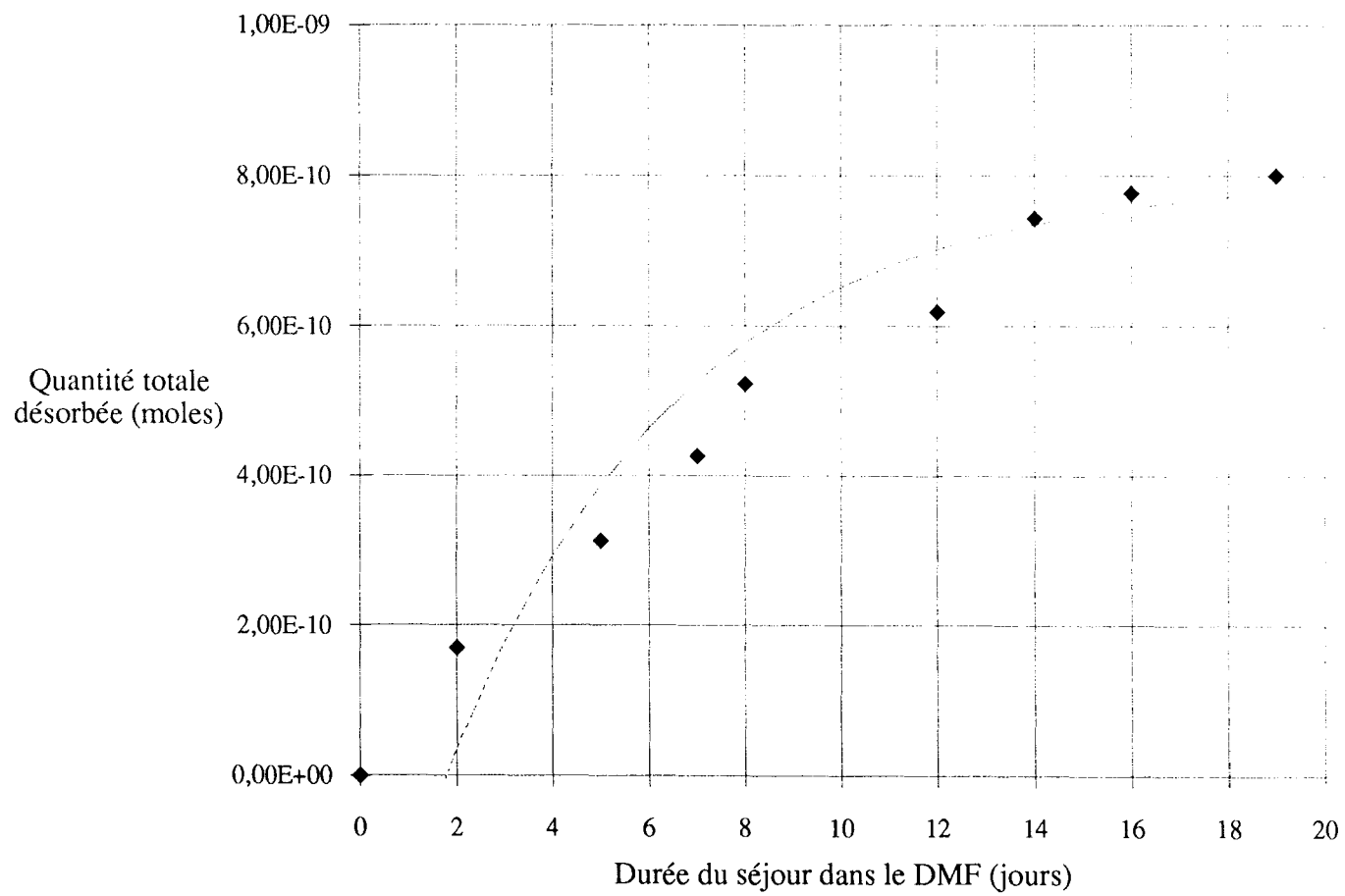
Courbe de désorption de la plaque 102 - s/e



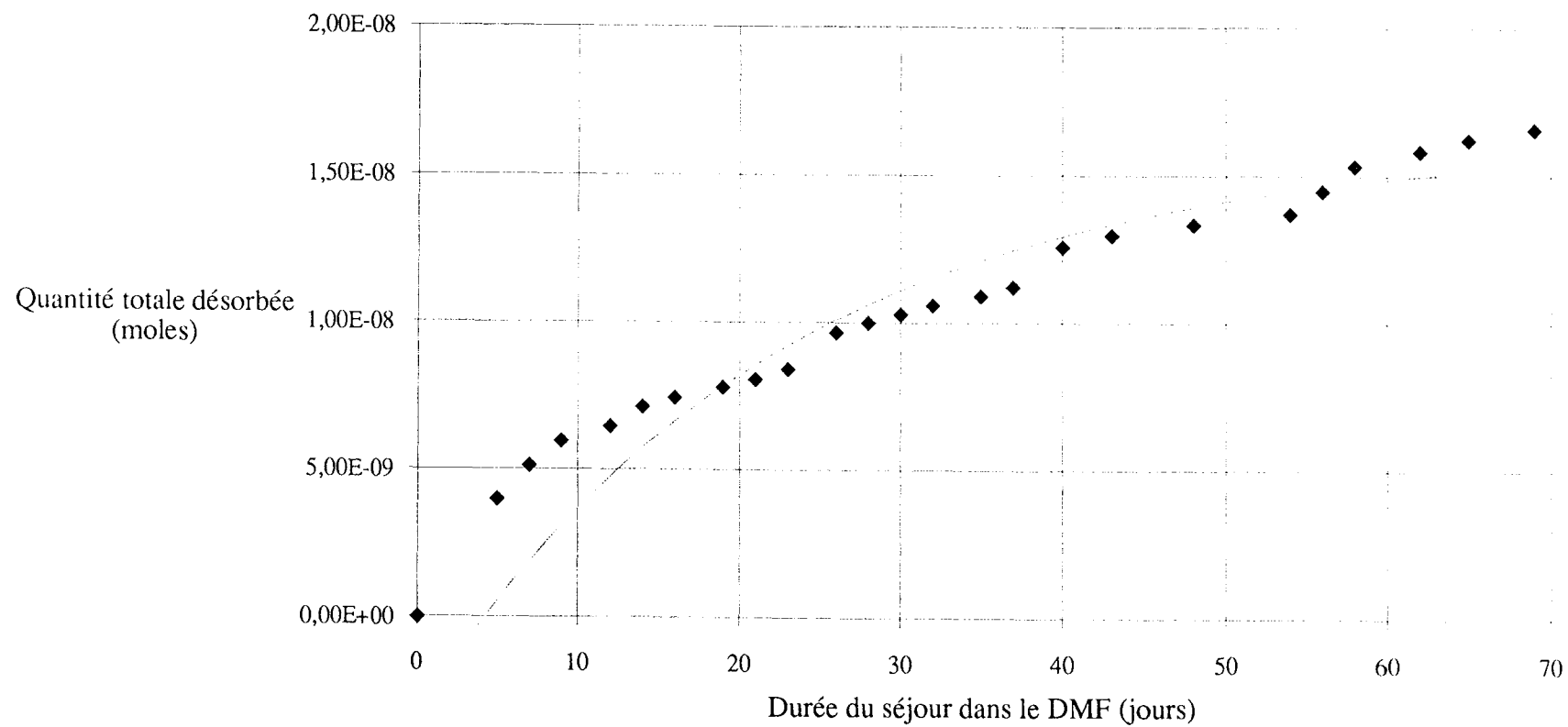
Courbe de désorption de la plaque 45 - v/ha



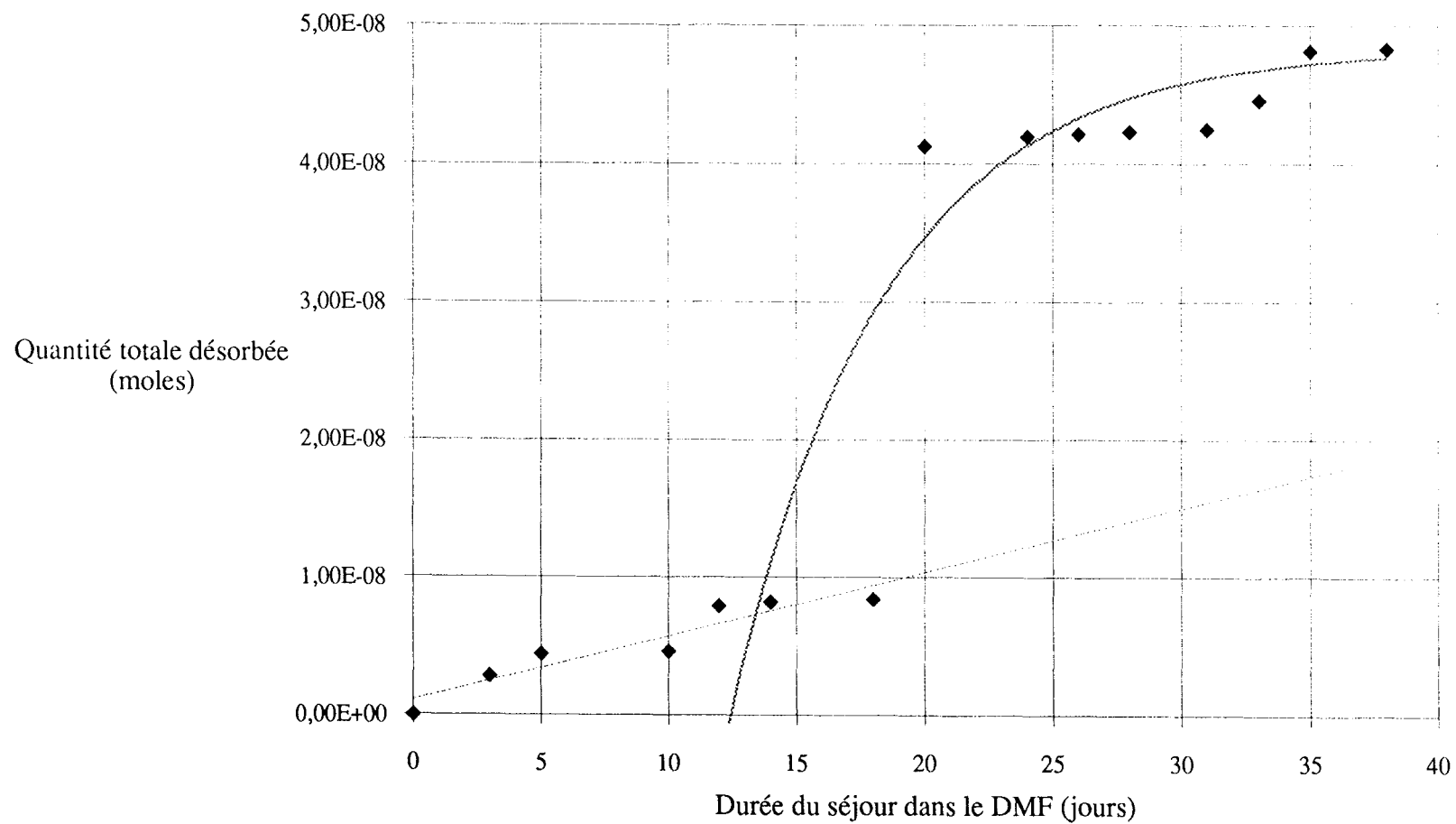
Courbe de désorption de la plaque 204 - v/c1a



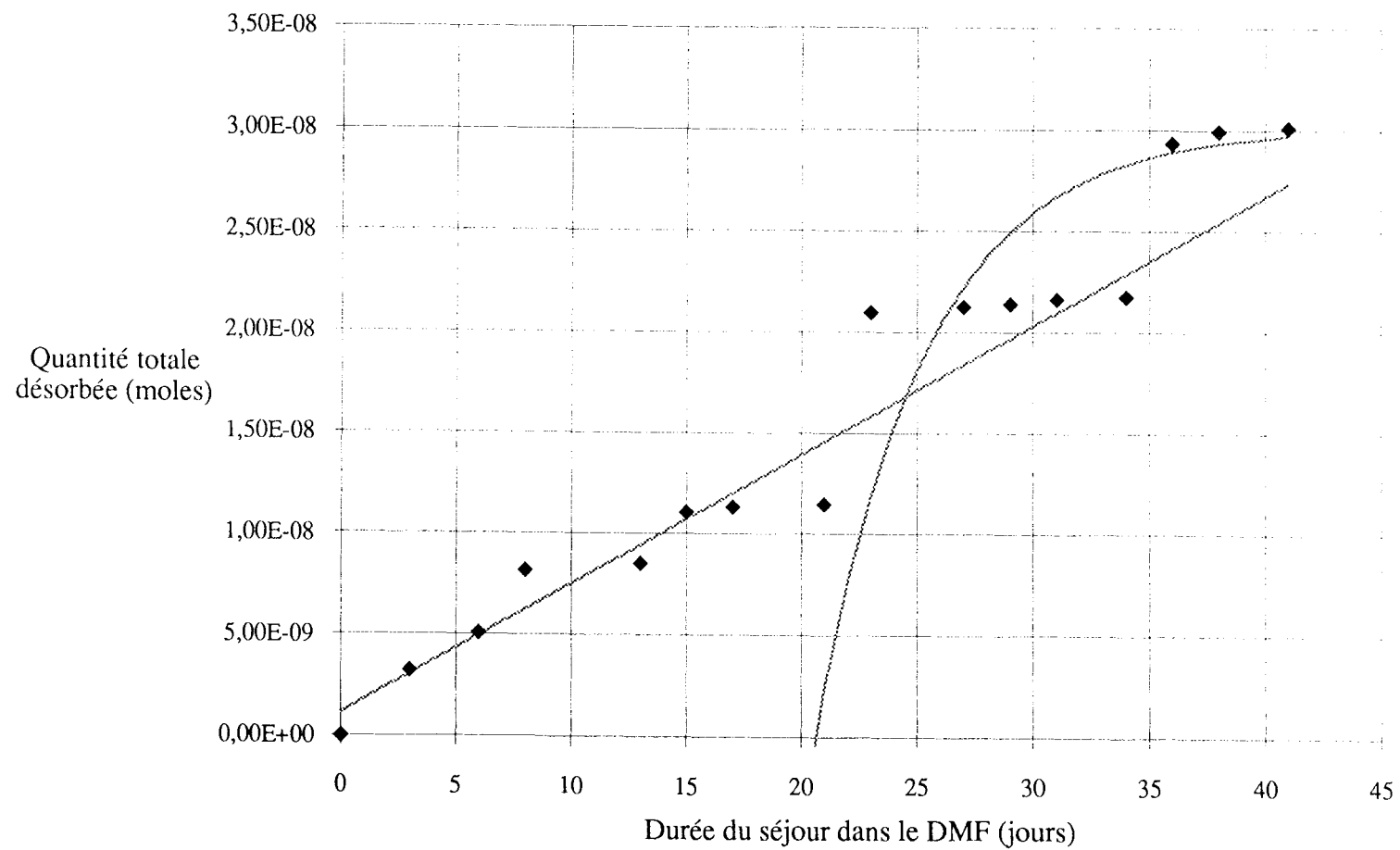
Courbe de désorption de la plaque 217 - s/c2e



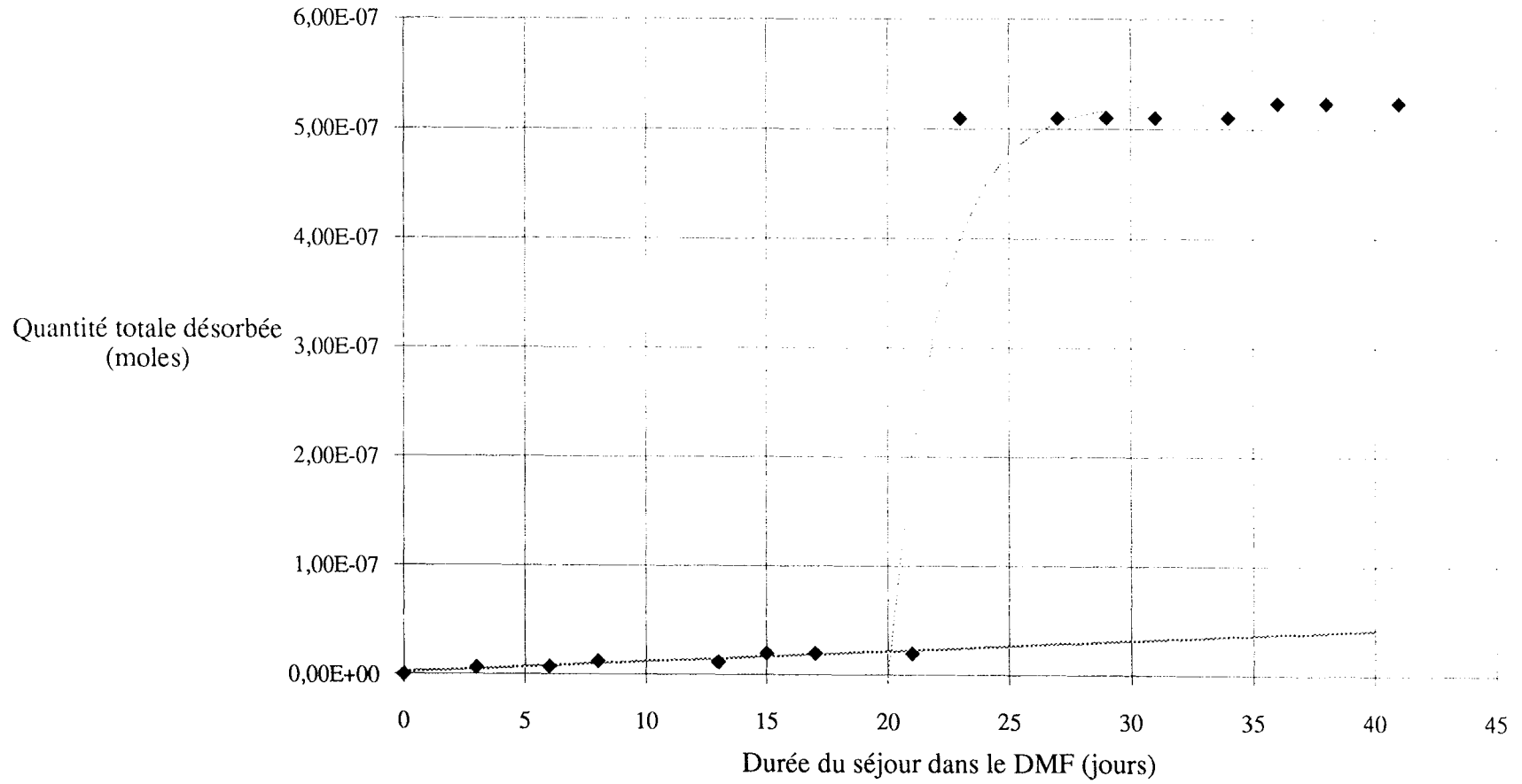
Courbe de désorption de la plaque 44 - v/a



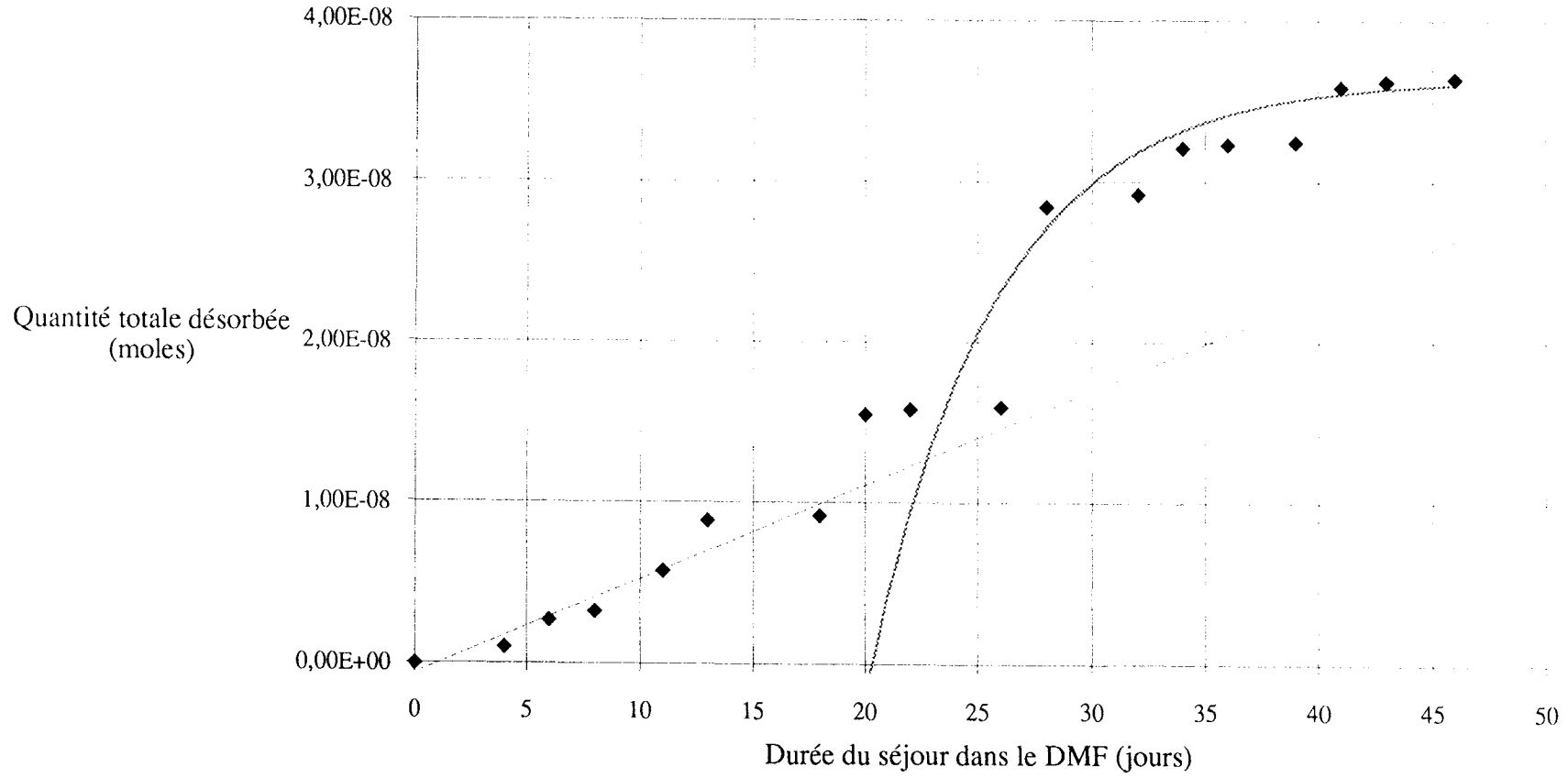
Courbe de désorption de la plaque 41 - v/e



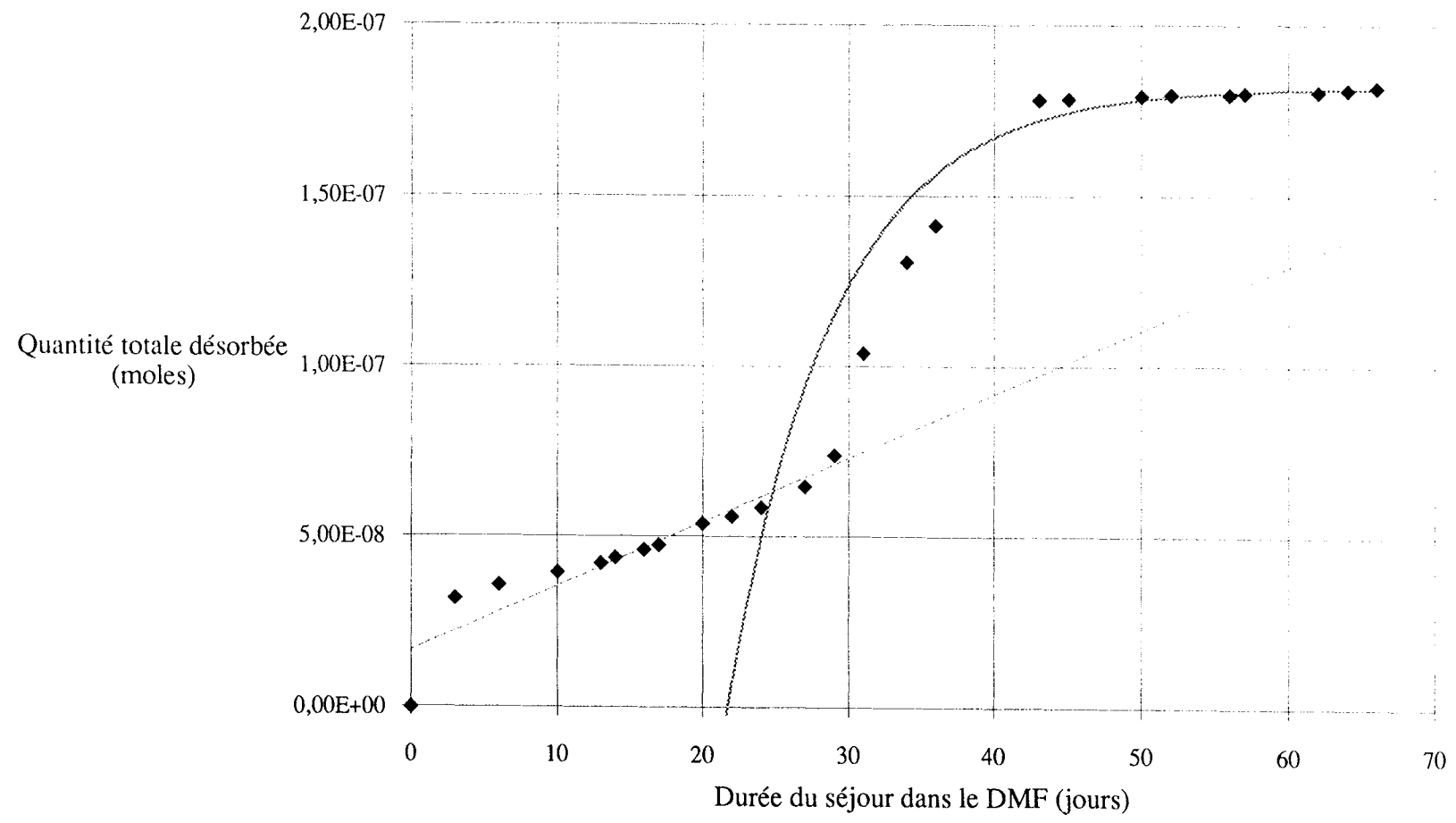
Courbe de désorption de la plaque 101 - s/e



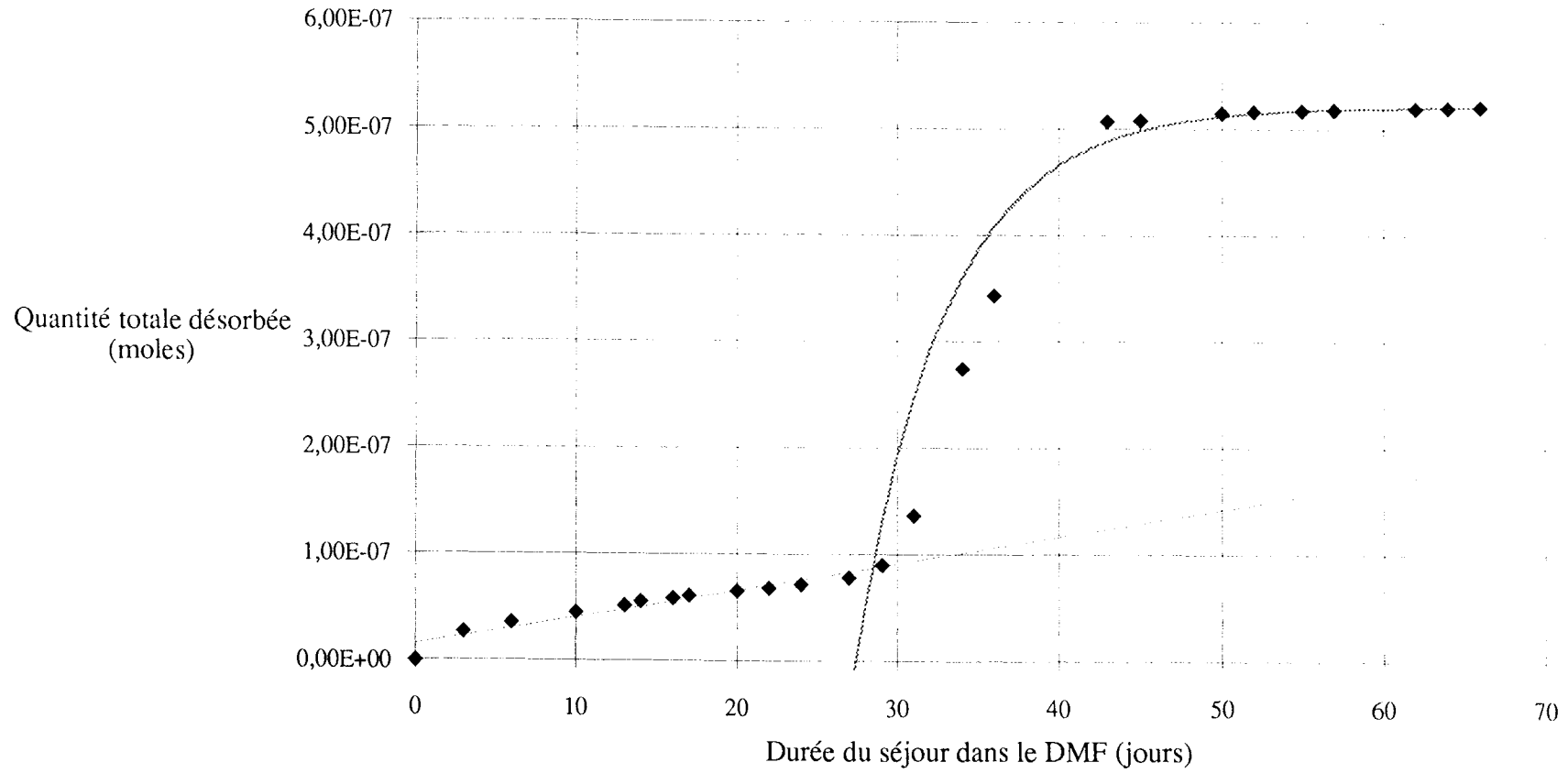
Courbe de désorption de la plaque 105 - s/ha



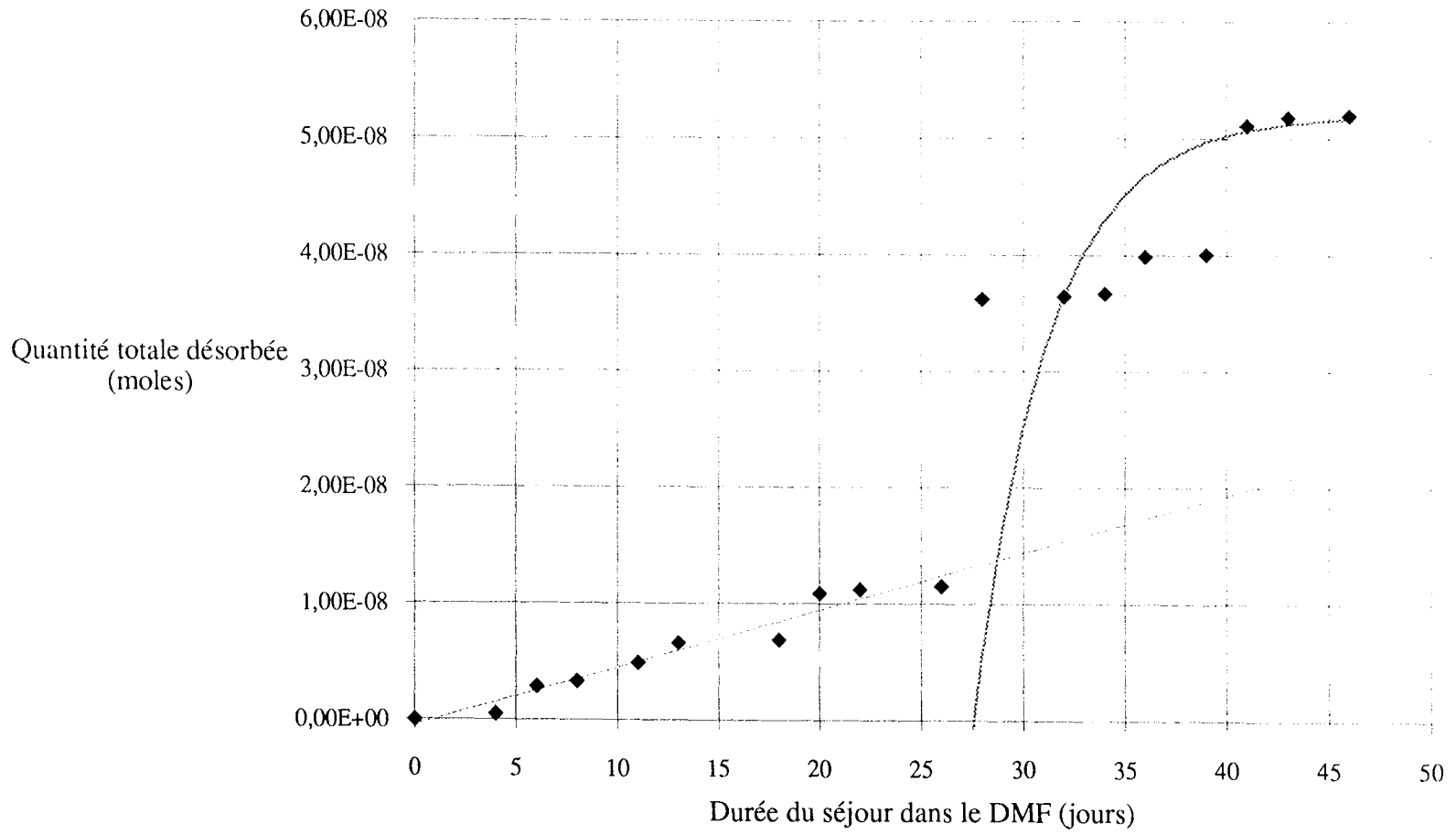
Courbe de désorption de la plaque 113 - s/ha



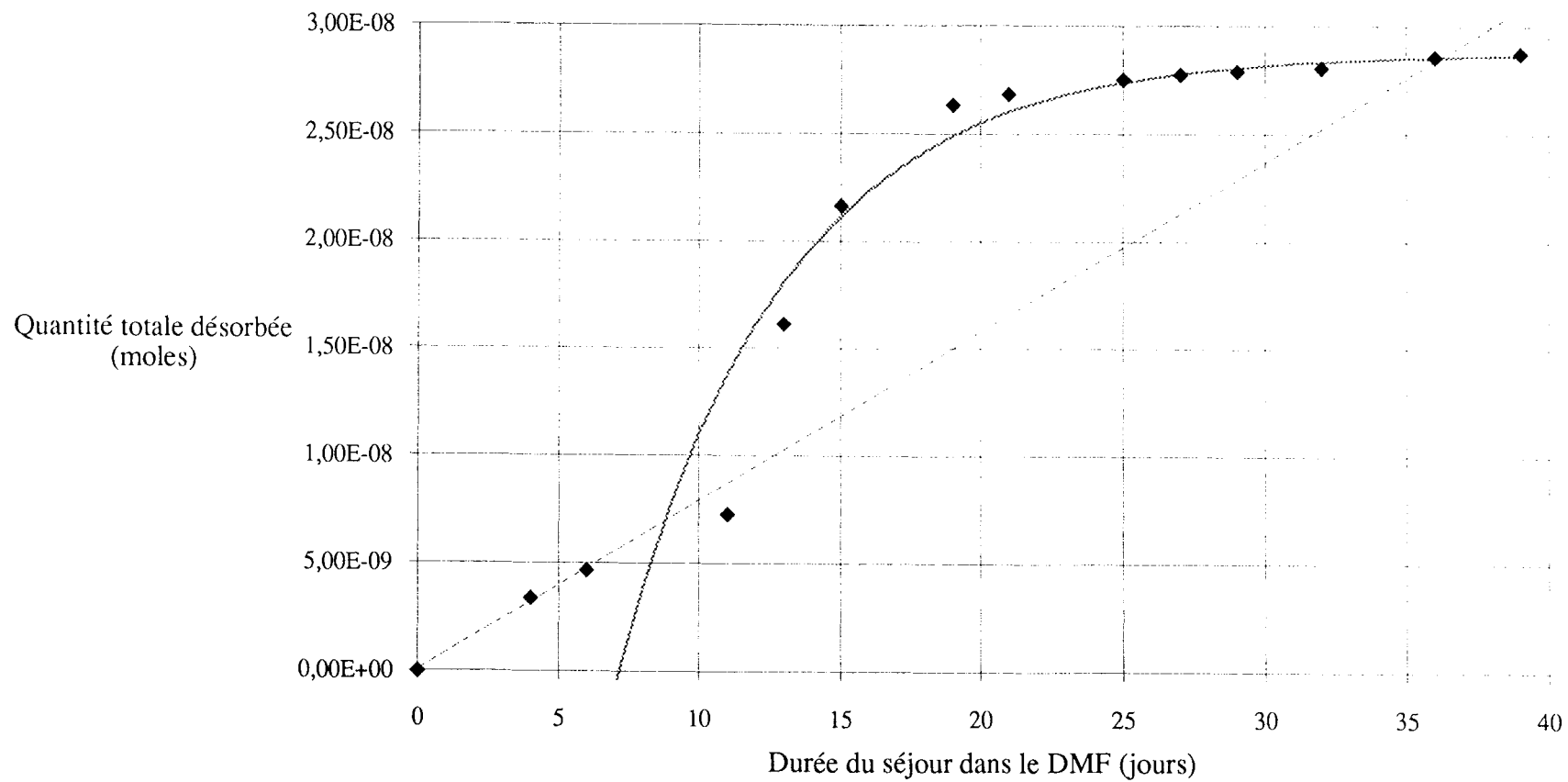
Courbe de désorption de la plaque 114 - s/ha



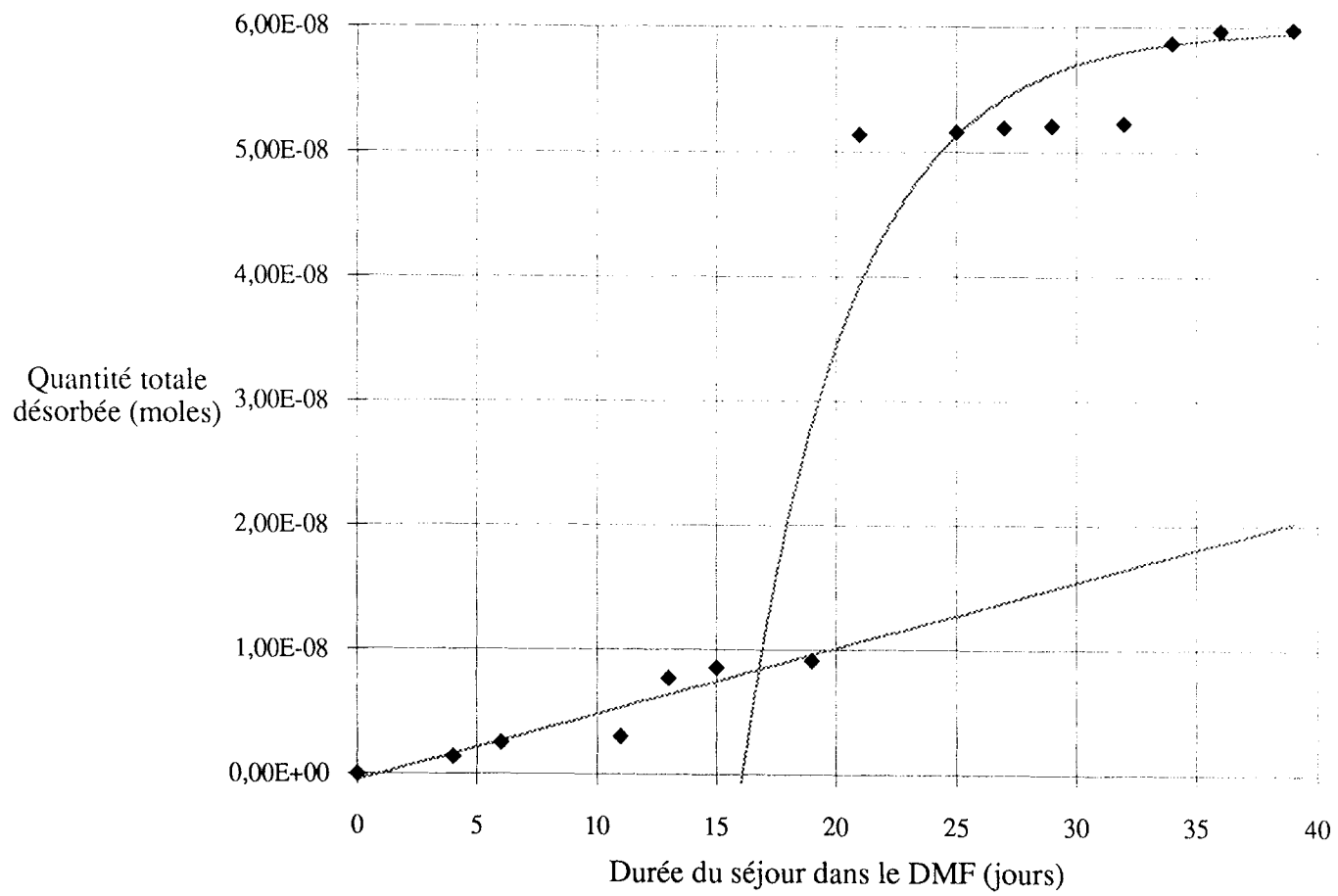
Courbe de désorption de la plaque 202 - v/he



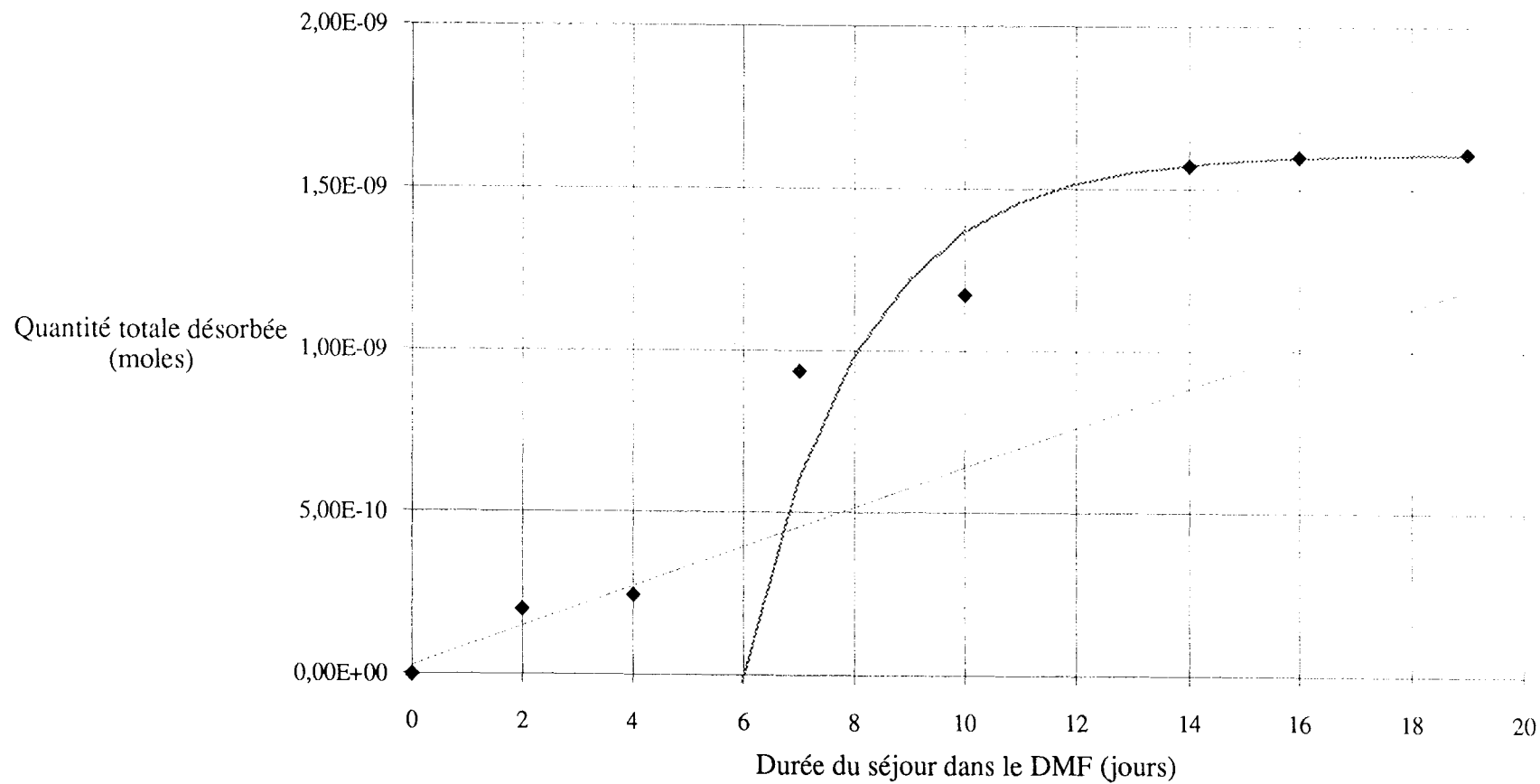
Courbe de désorption de la plaque 43 - v/he



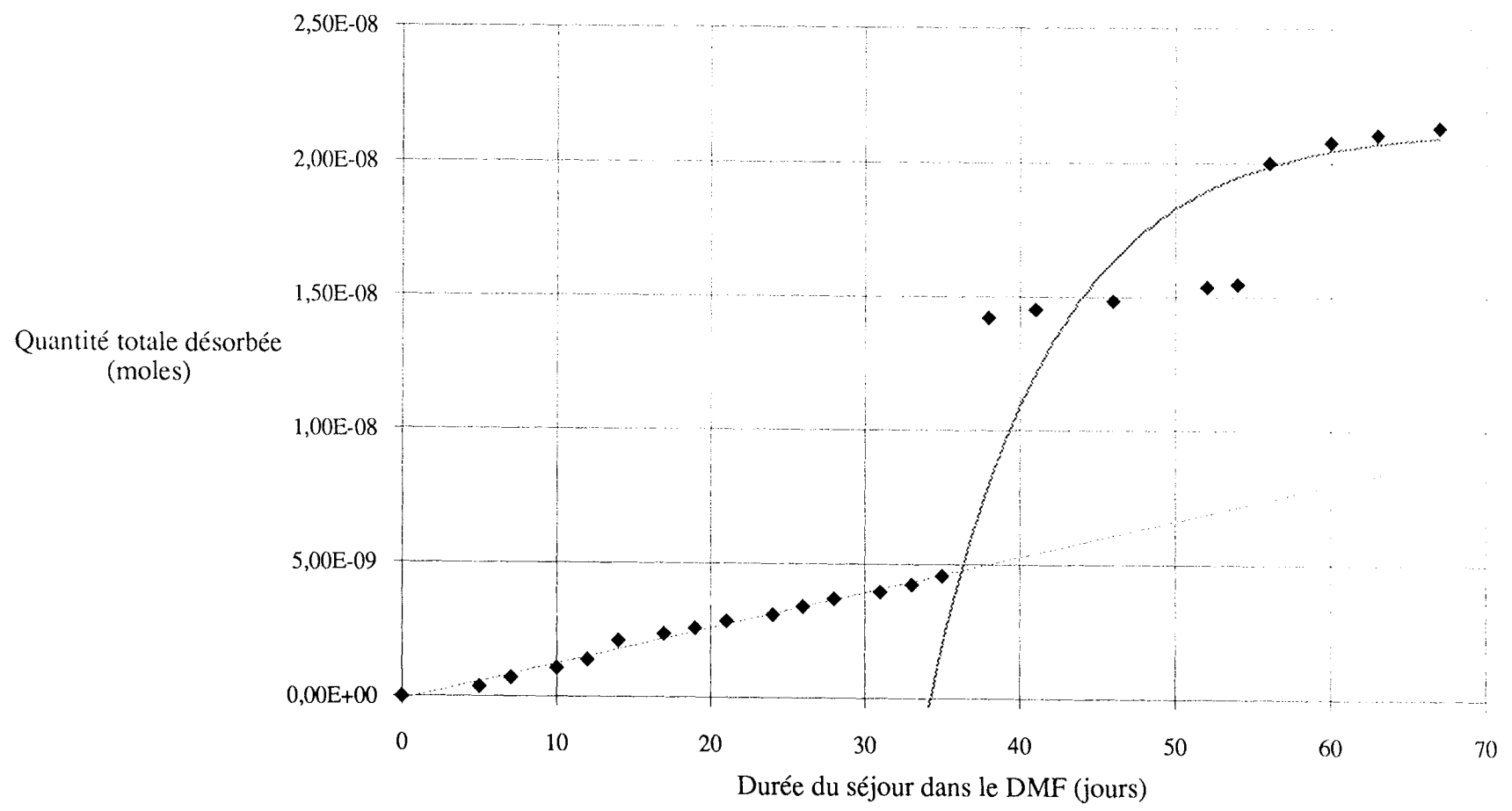
Courbe de désorption de la plaque 103 - s/he



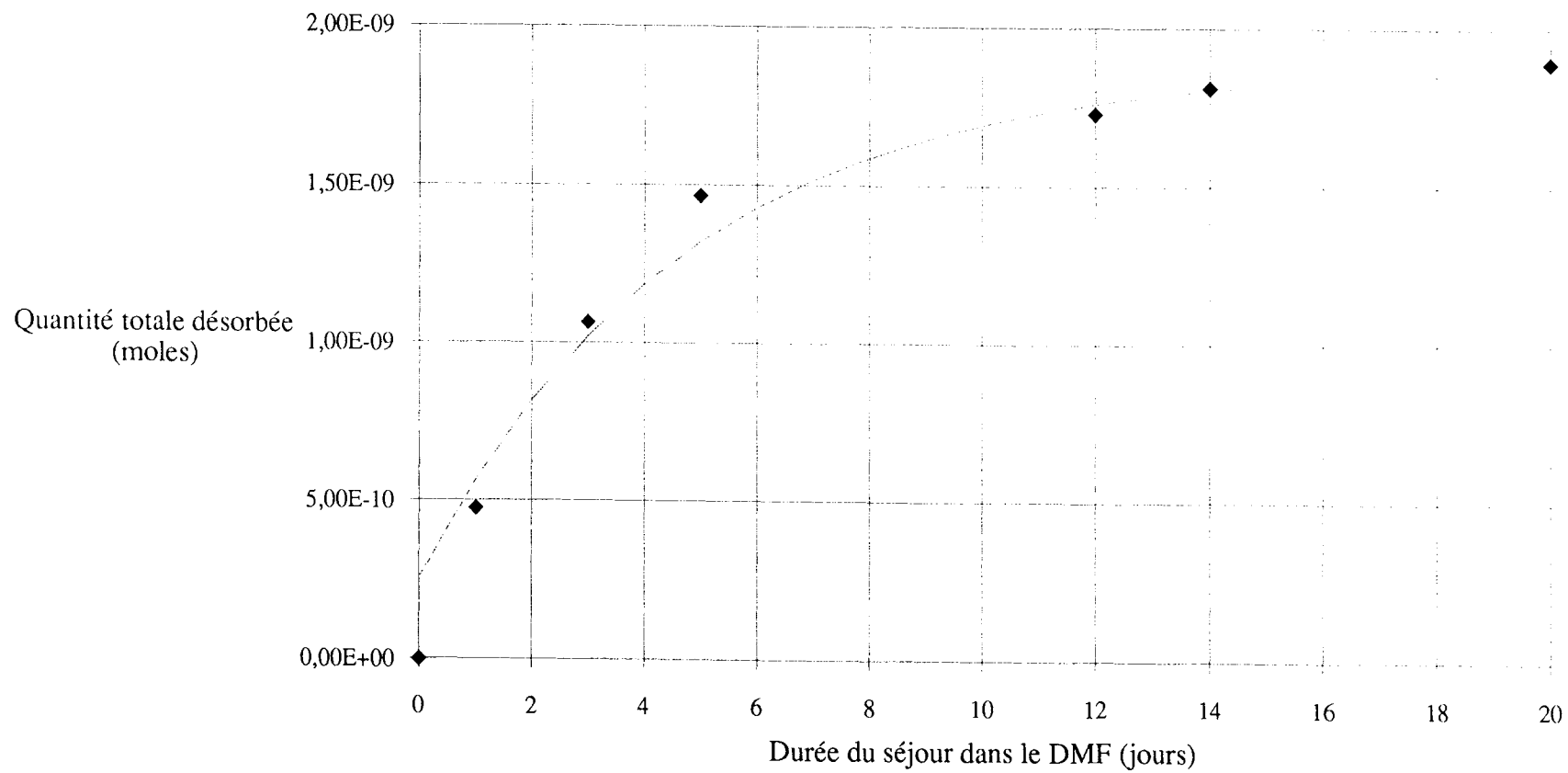
Courbe de désorption de la plaque 4 - s/c1a



Courbe de désorption de la plaque 216 s/c2e



Courbe de désorption de la plaque 219 - s/c1a



ANNEXE V

Tableau récapitulatif des plaques greffées

Le tableau (AV).1 ci-dessous donne le numéro des plaques, leur mode de silanisation ainsi que leur utilisation.

Tableau (AV).1.
Récapitulatif des plaques et leur utilisation.

Numéro de la plaque	Type de plaque	Mode de silanisation	Utilisation
4	silice	c ₁ a	optimisation du greffage
5	silice	a	stabilité dans l'eau immobile
10	verre	a	optimisation du greffage
12	verre	e	optimisation du greffage
16	silice	e	stabilité sous courant d'eau
17	silice	ha	stabilité sous courant d'eau
19	silice	c ₁ a	stabilité sous courant d'eau
21	silice	a	stabilité sous courant d'eau
41	verre	e	optimisation du greffage
43	verre	he	optimisation du greffage
44	verre	a	optimisation du greffage
45	verre	ha	optimisation du greffage
101	silice	e	optimisation du greffage
102	silice	e	optimisation du greffage
103	silice	he	optimisation du greffage
104	silice	a	optimisation du greffage
105	silice	ha	optimisation du greffage
113	silice	ha	optimisation du greffage
114	silice	ha	optimisation du greffage
121	silice	ha	analyse de l'eau d'écoulement
122	silice	ha	analyse de l'eau d'écoulement
202	verre	he	optimisation du greffage
203	silice	a	optimisation du greffage
204	verre	c ₁ a	optimisation du greffage
216	silice	c ₂ e	optimisation du greffage
217	silice	c ₂ e	optimisation du greffage
219	silice	c ₁ a	optimisation du greffage

RECAPITULATIF DES FIGURES ET TABLEAUX

Figures

Introduction

- Figure 1 : Schéma de principe du capteur.
Figure 2 : Forme attendue pour la réponse du capteur : intensité de fluorescence en fonction du temps.

Chapitre I

- Figure (I).1 : Obtention des silanols de surface.
Figure (I).2 : Types de silanols possibles sur la surface de la silice.
Figure (I).3 : Condensation des groupes silanol pour donner des ponts siloxane.
Figure (I).4 : Configurations des sites réactifs d'après Avnir, 1987.
Figure (I).5 : Stabilisation des molécules d'APTES par liaison hydrogène dans le cas d'une silanisation en milieux aqueux.
Figure (I).6 : Etat de la surface après une silanisation en présence d'eau.
Figure (I).7 : Schéma réactionnel de la catalyse par le chlorure de *para*-toluènesulphonyle de la réaction de silanisation.
Figure (I).8 : Description du mécanisme général de la catalyse par l'ammoniaque de la réaction de silanisation du méthyltriméthoxysilane.
Figure (I).9 : Mécanisme général de la catalyse par l'ammoniaque de la réaction de silanisation du méthyltriéthoxysilane avec rupture et formation simultanée d'une liaison.
Figure (I).10 : Interaction de l'APTES avec la surface en absence de triéthylamine.
Figure (I).11 : Epaisseur de la monocouche silane pour un diméthylalkylsilane.
Figure (I).12 : Détermination de la concentration théorique - cas simple (axe long de la molécule perpendiculaire ou parallèle à la surface).
Figure (I).13 : Arrangement le plus dense possible selon une monocouche.

Chapitre II

- Figure (II).1 : Formule chimique du 3-aminopropyltriéthoxysilane (APTES).
Figure (II).2 : Schéma réactionnel de la silanisation avec l'APTES : cas de conditions strictement anhydres.
Figure (II).3 : Dispositif expérimental pour la modification de la surface.
Figure (II).4 : Formule chimique de l'acide 4-(1-pyrényl)butyrique.

- Figure (II).5 : a. Activation de la fonction acide du fluorophore.
b. Fixation finale sur la surface.
c. Action de l'HOBt dans le couplage.
- Figure (II).6 : Spectre IR d'une plaque greffée avec une silanisation type ha. Présence de pics faibles dans la région 2800-3000 cm^{-1} .
- Figure (II).7 : Spectres d'émission de fluorescence pour une excitation à 337 nm.
A - APB greffé et B- APB libre.
- Figure (II).8 : Spectres d'émission de fluorescence d'APB greffé excité à 337 nm.
C - sans filtre à l'excitation et D - avec filtre à l'excitation.
- Figure (II).9 : Spectres d'émission de fluorescence de l'APB pour une excitation à 337 nm.
E - plaque greffée dans l'air et F - plaque non greffée dans l'air.
- Figure (II).10 : Image au microscope fluorescent d'une surface greffée avec une silanisation ha - x 200.
- Figure (II).11 : a. Microscope à force de cisaillement : état de la surface avant tout traitement.
b. Microscope à force de cisaillement : état de la surface après une activation dans un milieu acide.
c. Microscope à force de cisaillement : état de la surface après une silanisation type ha.
d. Microscope à force de cisaillement : état de la surface après le couplage avec l'APB.
- Figure (II).12 : Microscope à force de cisaillement : état de la surface après une silanisation de type a.
- Figure (II).13 : Microscope à force de cisaillement : état de la surface après silanisation de type e.
- Figure (II).14 : Microscope à force de cisaillement : état de la surface après une silanisation de type ha.
- Figure (II).15 : Microscope à force de cisaillement : état de la surface après une silanisation de type c₂e.
- Figure (II).16 : Schéma des étapes de la désorption.
- Figure (II).17 : Courbe de désorption montrant un comportement exponentiel. Plaque en silice, silanisation e.
- Figure (II).18 : Courbe de désorption montrant un comportement mixte. Plaque en silice, silanisation ha.
- Figure (II).19 : Etat de la surface après des silanisations entraînant une loi de désorption purement exponentielle.

- Figure (II).20 : Etat de la surface après des silanisations entraînant une loi de désorption mixte.
- Figure (II).21 : Système de maintien de la plaque pendant son séjour dans l'eau.
- Figure (II).22 : Intensité de fluorescence à 376 nm de l'eau où a séjourné la plaque silanisée a (plaque 5).
- Figure (II).23 : Système de maintien de la plaque pour l'analyse de l'action d'un courant d'eau.
- Figure (II).24 : Intensité de fluorescence à 376 nm mesurée sur la plaque 16 pour les 5 niveaux après chaque traitement sous l'eau.
- Figure (II).25 : Intensité de fluorescence à 376 nm mesurée sur la plaque 17 pour les 5 niveaux après chaque traitement sous l'eau.
- Figure (II).26 : Intensité de fluorescence à 376 nm mesurée sur la plaque 19 pour les 5 niveaux après chaque traitement sous l'eau.
- Figure (II).27 : Intensité de fluorescence à 376 nm mesurée sur la plaque 21 pour les 5 niveaux après chaque traitement sous l'eau.
- Figure (II).28 : Circulation de l'eau pour l'analyse en continu.
- Figure (II).29 : Emission de fluorescence à 376 nm de l'eau pendant le séjour de la plaque 121.
- Figure (II).30 : Emission de fluorescence à 376 nm de l'eau pendant le séjour de la plaque 122.
- Figure (II).31 : Intensité de fluorescence du tube à 376 nm pour une excitation à 337 nm pendant l'écoulement de l'eau à vitesse maximale pour une durée totale de 2400 s (une analyse toutes les 5 s).
- Figure (II).32 : Intensité de fluorescence du tube à 376 nm pour une excitation à 337 nm pendant l'écoulement de l'eau à vitesse maximale pour une durée totale de 1500 s (une analyse toutes les 5 s).

Chapitre III

- Figure (III).1 : Configuration finale du capteur.
- Figure (III).2 : Système d'excitation - Focalisation de la lumière sortie du laser sur l'extrémité de la fibre optique.
- Figure (III).3 : Système de guidage de la lumière par fibres optiques.
- Figure (III).4 : Dispositif de maintien de la surface modifiée dans le capteur.
- Figure (III).5 : Schéma optique dans le spectrofluorimètre.

- Figure (III).6 : Intensités de fluorescence relatives en fonction de la concentration en sulfites dans le milieu pour différentes concentrations initiales de sulfite de sodium (ajout toutes les 10 minutes).
- Figure (III).7 : Droite de Stern-Volmer pour le capteur plongé dans l'eau.
- Figure (III).8 : Spectre d'émission de fluorescence du capteur. Série 1. $[O_2]=2,4$ mg/L.
- Figure (III).9 : Spectre d'émission de fluorescence du capteur. Série 1. $[O_2]=18,5$ mg/L.
- Figure (III).10 : Spectre d'émission de fluorescence du capteur. Série 2. $[O_2]=1,6$ mg/L.
- Figure (III).11 : Spectre d'émission de fluorescence du capteur. Série 2. $[O_2]=13,0$ mg/L.
- Figure (III).12 : Droite de Stern-Volmer pour les deux essais.
- Figure (III).13 : Optimisation des résultats pour la première série de valeurs.
- Figure (III).14 : Optimisation des résultats pour la deuxième série de valeurs.

Chapitre IV

- Figure (IV).1 : Compromis entre le type d'excitation, le fluorophore et le type de mesure.
- Figure (IV).2 : Analyse de la fluorescence des ondes évanescentes, montage décrit et utilisé par Sutherland et al., 1984.
- Figure (III).3 : Détermination de la pression partielle en oxygène dans un courant gazeux.
- Figure (IV).4 : Spectres d'émission de fluorescence d'une même plaque dans différents solvants.
- Figure (IV).5 : Effet des bulles de gaz passant devant le capteur.

Annexe III

- Figure (AIII).1 : Spectres de fluorescence du pyrène à différentes concentrations, dans le cyclohexane, d'après Birks, 1970.
- Figure (AIII).2 : Schéma de principe d'un spectrofluorimètre.
- Figure (AIII).3 : Spectres de l'APB.
- Figure (AIII).4 : Droite d'étalonnage APB/DMF.
- Figure (AIII).5 : Droite d'étalonnage APB/NaOH.

Tableaux

Chapitre I

- Tableau (I).1 : Rapports d'intensités obtenues par XPS après différents traitements de la surface SiO₂.
- Tableau (I).2 : Composition en éléments de la surface silice avant et après l'activation. Résultats de spectrométrie d'électrons Auger.
- Tableau (I).3 : Méthodes d'analyse de l'influence de l'eau sur la qualité de la surface silanisée (décrites dans la littérature).
- Tableau (I).4 : Méthodes de détermination de la géométrie du dépôt silane (décrites dans la littérature).
- Tableau (I).5 : Méthodes d'analyse de la stabilité de la surface silanisée.
- Tableau (I).6 : Rapport des surfaces des pics SiCH₃/Si-O-Si pour une quantité de 0,4 mmol de catalyseur.
- Tableau (I).7 : Méthodes de détermination et valeurs des densités de greffage.
- Tableau (I).8 : Quelques concentrations de surface citées dans la littérature et leurs méthodes de détermination.

Chapitre II

- Tableau (II).1 : Notations utilisées pour différencier les modes de silanisation.
- Tableau (II).2 : Quantité d'APB désorbé pour chaque type de surface et suivant chaque type de silanisation.
- Tableau (II).3 : Concentrations résiduelles d'APB pour chaque type de surface et suivant chaque type de silanisation.
- Tableau (II).4 : Concentrations de surface (C_{dés} et C_{rés}) pour chaque type de surface suivant chaque mode de silanisation.
- Tableau (II).5 : Valeurs du coefficient k₁ pour chaque plaque et chaque type de silanisation - Comportement purement exponentiel.
- Tableau (II).6 : Valeurs des coefficients k₀, t₀ et k₁ pour chaque plaque et chaque type de silanisation - Comportement mixte.
- Tableau (II).7 : Quantités d'APB présentes dans l'eau où a séjourné une plaque silanisée a (plaque 5).
- Tableau (II).8 : Récapitulatif des conditions expérimentales de greffage des plaques avant l'étude de la stabilité sous un courant d'eau.

Tableau (II).9 : Intensité de fluorescence des différents niveaux pour une silanisation e (plaque 16).

Tableau (II).10 : Intensité de fluorescence des différents niveaux pour une silanisation ha (plaque 17).

Tableau (II).11 : Intensité de fluorescence des différents niveaux pour une silanisation c_{1a} (plaque 19).

Tableau (II).12 : Intensité de fluorescence des différents niveaux pour une silanisation a (plaque 21).

Chapitre III

Tableau (III).1 : Caractéristiques du laser pulsé à azote.

Tableau (III).2 : Tableau des concentrations en consommateurs d'oxygène.

Tableau (III).3 : Valeurs pour la droite de Stern-Volmer obtenues avec le capteur dans l'eau.

Tableau (III).4 : Valeurs de la constante de Stern-Volmer de l'APB dissous dans l'eau ([APB = 10⁻⁵ mol/L) en fonction de la température [Bellil, 1994].

Tableau (III).5 : Réponse du capteur en fonction de la concentration en oxygène dissous - Série 1.

Tableau (III).6 : Réponse du capteur en fonction de la concentration en oxygène dissous - Série 2.

Tableau (III).7 : Valeur de la constante K_S.

Tableau (III).8 : Valeurs calculées de k_La.

Annexe I

Tableau (AI).1 : Possibilités offertes par le greffage.

Tableau (AI).2 : Abréviations utilisées pour les silanes : X_n-SiR_{4-n}.

Annexe II

Tableau (AII).1 : Techniques d'analyse utilisant des particules.

Tableau (AII).2 : Techniques d'analyse utilisant un champ électrique ou une force mécanique.

Annexe III

Tableau (AIII).1 : Intensité de fluorescence de l'APB à 376 nm en fonction de la concentration dans du DMF.

Tableau (AIII).2 : Intensité de fluorescence de l'APB à 376 nm en fonction de la concentration dans NaOH 1 M.

Annexe V

Tableau (AV).1 : Récapitulatif des plaques et leur utilisation

LISTE DES ABREVIATIONS ET SYMBOLES

Abréviations scientifiques

AAprop	N-(2-aminoéthyl-3-aminopropyl)triméthoxysilane
ADS	4-aminobutyldiméthylméthoxysilane
APB	acide 4-(1-pyrényl)butyrique
APTES	3-aminopropyltriéthoxysilane
ATS	4-aminobutyltriéthoxysilane
DCCI	1,3-dicyclohexylcarbodiimide
DMF	N,N-diméthylformamide
DMS	chlorodiméthyl-octadécylsilane
EDC	1-éthyl-3-[3-(diméthylamino)propyl]carbodiimide
FITC	fluorescéine isothiocyanate
GMBS	ester N- γ -maléimidobutyryloxy succinimide
GOPS	3-glycidoxypropyltriméthoxysilane
HCC	acide 7-hydroxycoumarin-3-carboxylique
HOBT	hydroxybenzotriazol
HPTS	1-hydroxypyrène-3,6,8-trisulphochlorure
MDS	mercaptométhyl-diméthyléthoxysilane
MPS	méthacryloyloxypropyltriméthoxysilane
MTS	mercaptopropyltriméthoxysilane
OTS	octadécyltrichlorosilane
THF	tétrahydrofurane
TMS	triméthylchlorosilane

Abréviations administratives

DCPR	Département de Chimie - Physique des Réactions
ENSIC	Ecole Nationale Supérieure des Industries Chimiques
GRAPP	Groupe de Recherches et Applications en Photophysique et Photochimie
INPL	Institut National Polytechnique de Lorraine
LSGC	Laboratoire des Sciences du Génie Chimique

Symboles

Nom	Nature	Unité
α	pente de la droite $I = f(\text{temps de séjour sous l'eau})$	(u.a./min)
$C_{\text{dés}}$	concentration surfacique en molécules désorbées	($\mu\text{mol}/\text{m}^2$)
C_G	concentration en gaz dans la phase gazeuse à l'instant t	(mol/m^3)
C_L	concentration en gaz dans la phase liquide à l'instant t	(mol/m^3)
C_{L0}	concentration en gaz dans la phase liquide à $t = 0$	(mol/m^3)
$C_{\text{rés}}$	concentration surfacique en molécules greffées	($\mu\text{mol}/\text{m}^2$)
h	constante de Planck	
I	intensité de fluorescence	(u.a.)
I_a	vitesse d'absorption des photons	
I_0	intensité de fluorescence sans inhibition	(u.a.)
k	constante de vitesse de la désorption	(s^{-1})
k_f	constante de vitesse d'émission de la fluorescence	(s^{-1})
$k_{L,a}$	coefficient de transfert volumique	(s^{-1})
k_{nr}	constante de vitesse des processus non radiatifs	(s^{-1})
k_Q	constante de vitesse de l'inhibition de fluorescence	(s^{-1})
k_0	constante de vitesse de la désorption - cinétique d'ordre 0	(jour^{-1})
k_1	constante de vitesse de la désorption - cinétique du premier ordre	(jour^{-1})
K_s	constante (pente) de la droite de Stern-Volmer	($\text{m}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$)
λ_{em}	longueur d'onde d'émission de fluorescence	(nm)
λ_{ex}	longueur d'onde d'excitation	(nm)
m	constante d'équilibre de dissolution de l'oxygène dans l'eau	
ν	nombre d'onde	(nm^{-1})
P	pourcentage de molécules désorbées à l'instant	(%)
P_∞	pourcentage de molécules désorbées à $t = \infty$	(%)
$[Q]$	concentration en inhibiteur	(mol/m^3)
$Q_{\text{dés}}$	quantité de molécules désorbées à l'instant t	(mol)
Q_s	quantité de molécules restant adsorbées à la surface à l'instant t	(mol)
Q_{s_0}	quantité de molécules adsorbées à $t = 0$	(mol)
$[S_1]$	concentration en molécules dans l'état singulet S_1	(mol/m^3)
t	temps	(s)
t_0	début de la désorption	(jour)
τ_0	durée de vie de l'état excité	(s)
τ_1	temps de réponse de la sonde à oxygène	(s)

PRODUITS ET SOLVANTS UTILISES

Produit/solvant	Formule	Fabricant	Référence	Pureté	M (g/mol)	d (g.mL ⁻¹)
Acétone	C ₂ H ₆ O	SdS	005 00 22	99,5	58,08	0,789
Acide nitrique	HNO ₃	Prolabo	20 406.292	68	63,01	1,41
Acide 4-(1-pyrényl)butyrique	C ₂₀ H ₁₆ O ₂	Fluka	82655	> 97	288,35	
Acide sulfurique	H ₂ SO ₄	Fluka	84718	> 95	98,08	1,83
3-Aminopropyltriéthoxysilane	C ₉ H ₂₃ NO ₃ Si	Aldrich	11,339-5	98	221,37	0,942
Chlorure de <i>p</i> -toluènesulphonyle	C ₇ H ₇ ClO ₂ S	Fluka	89730	> 99	190,65	
Dichlorométhane	CH ₂ Cl ₂	SdS	029 02E 40	> 99,8	84,93	1,326
1,3-Dicyclohexylcarbodiimide	C ₁₃ H ₂₂ N ₂	Aldrich	D8,000-2	99	206,33	
N,N-Diméthylformamide	C ₃ H ₈ NO	SdS	34 27 16	99,8	73,10	0,948
Hexane	C ₆ H ₁₄	SdS	52 2730 21	> 99	86,18	0,6603
1-Hydroxybenzotriazol	C ₆ H ₅ N ₃ O.aq	Aldrich	36,244-1	95	135,13	
Hydroxyde de sodium	NaOH	Fluka	71689	> 98	40	
Méthanol	CH ₄ O	SdS	093 37 16	> 99,8	32,04	0,791
Pyridine	C ₅ H ₅ N	Aldrich	27,040-7	99,9	79,10	0,978
Sulfite de sodium	Na ₂ SO ₃	Fluka	71988	> 98	126,04	
Toluène	C ₇ H ₈	SdS	071 27 21	> 99,3	92,14	0,866
Triéthylamine	C ₆ H ₁₅ N	Fluka	90337	> 99,5	101,19	0,726

BIBLIOGRAPHIE

AUE W.A., C.R. HASTINGS [1969]

Preparation and chromatographic uses of surface-bonded silicones
J. Chromatogr., **42**, 319-335

AVNIR D. [1987]

The geometry factor in photoprocesses on irregular (fractal) surfaces. 1. Static considerations

J. Am. Chem. Soc., **109**, 2931-2938

BATAILLARD P., F. GARDIES, N. JAFFREZIC-RENAULT, C. MARTELET, B. COLIN, B. MANDRAND [1988]

Direct detection of immunospecies by capacitance measurements
Anal. Chem., **60**, 2374-2379

BAYER E., K. ALBERT, J. REINERS, M. NIEDER, D. MÜLLER [1983]

Characterization of chemically modified silica gels by ^{29}Si and ^{13}C cross-polarization and magic angle spinning nuclear magnetic resonance

J. Chromatogr., **264**, 197-213

BELLIL A. [1994]

Mise au point et modélisation d'un capteur à fibre optique pour le dosage par fluorescence de l'oxygène en milieu marin

Thèse INPL-ENSIC-DCPR/GRAPP, Nancy

BHATIA S.K., L.C. SHRIVER-LAKE, K.J. PRIOR, J.H. GEORGER, J.M. CALVERT, R. BREDEHORST, F.S. LIGLER [1989]

Use of thiol-terminal silanes and heterobifunctional crosslinkers for immobilization of antibodies on silica surfaces

Anal. Biochem., **178**, 408-413

BILLARD V., C. MARTELET, P. BINDER, J. THERASSE [1991]

Toxin detection using capacitance measurements on immunospecies grafted onto a semiconductor substrate

Anal. Chim. Acta, **249**, 367-372

BIRKS J.B. [1970]

Dans "Photophysics of aromatic molecules", Wiley-Interscience, John Wiley & Sons Ltd, London

BLITZ J.P., R.S.S. MURTHY, D.E. LEYDEN [1987]

Ammonia-catalyzed silylation reactions of Cab-O-Sil with methoxymethylsilanes

J. Am. Chem. Soc., **109**, 7141-7145

BLITZ J.P., R.S.S. MURTHY, D.E. LEYDEN [1988]_a

Studies of silylation of Cab-O-Sil with methoxymethylsilanes by diffuse reflectance FTIR spectroscopy

J. Colloid Interface Sci., **121**, 63-69

BLITZ J.P., R.S.S. MURTHY, D.E. LEYDEN [1988]_b

The role of amine structure on catalytic activity for silylation reactions with Cab-O-Sil

J. Colloid Interface Sci., **126**, 387-392

BOSSHARD H.R., I. SCHECHTER, A. BERGER [1973]

New method for the detection of racemization during peptide synthesis. Stereoselective hydrolysis of diastereomeric peptides by leucine aminopeptidase

Helv. Chim. Acta, **56**, 717-723

BRIGHT F.V., T.A. BETTS, K.S. LITWILER [1990]

Regenerable fiber-optic-based immunosensor
Anal. Chem., **62**, 1065-1069

BRITCHER L.G., D.C. KEHOE, J.G. MATISONS, R.S.C. SMART, A.G. SWINCER [1993]

Silicones on glass surfaces. - 2 - Coupling agent analogs
Langmuir, **9**, 1609-1613

BURBAGE J.D., M.J. WIRTH [1992]

Effect of wetting on the reorientation of acridine orange at the interface of water and a hydrophobic surface
J. Phys. Chem., **96**, 5943-5948

CAMERMAN A., J. TROTTER [1965]

The crystal and molecular structure of pyrene
Acta. Cryst., **18**, 636-643

CARRIER E., A. GUYOT, A. REVILLON, M.F. LLAURO-DARRICADES, R. PETIAUD [1991]

Functional polymers supported on porous silica - I. Grafting active precursors onto porous silica
Reactive polymers, **16**, 41-49

CHIANG C.-H., H. ISHIDA, J.L. KOENIG [1980]

The structure of γ -aminopropyltriethoxysilane on glass surfaces
J. Colloid Interface Sci., **74**, 396-404

CLAUDON P., M. DONNER, J.F. STOLTZ [1991]

Potential interest of optical fibres as immunosensors : study of different antigen coupling methods
J. Mat. Sci. : Mat. in Med., **2**, 197-201

COLIN H., G. GUIOCHON [1977]

Introduction to reversed-phase high-performance liquid chromatography
J. Chromatogr., **141**, 289-312

DiBENEDETTO A.T., D.A. SCOLA [1978]

Characterization of S-glass/polymer interfaces using ion scattering spectroscopy and scattered ion mass spectroscopy
J. Colloid Interface Sci., **64**, 480-500

DUBOIS L.H., B.R. ZEGARSKY [1993]

Bonding of alkoxysilanes to dehydroxylated silica surfaces : a new adhesion mechanism
J. Phys. Chem., **97**, 1665-1670

DUVAULT Y., A. GAGNAIRE, F. GARDIES, N. JAFFREZIC-RENAULT, C. MARTELET, D. MOREL, J. SERPINET, J.L. DUVAULT [1990]

Physicochemical characterization of covalently bonded alkyl monolayers on silica surfaces
Thin Solid Films, **185**, 169-179

ESSER P. [1988]

Principles in adsorption to polystyrene
Nunc Bulletin, **6**, 1-5

FULLER E.C., R.H. CRIST, [1941]

Rate of oxidation of sulfite ions by oxygen
J. Am. Chem. Soc., **63**, 1644-1650

GOODWIN J.W., R.S. HARBRON, P.A. REYNOLDS [1990]

Functionalization of colloidal silica and silica surfaces via silylation reactions
Colloid Polym. Sci., **268**, 766-777

GRANDCLAUDON M. [1990]

Etude du transfert de matière à l'interface gaz-liquide par chimiluminescence
Thèse INPL-ENSIC-LSGC-DCPR/GRAPP, Nancy

GRONDIN O. [1994]

Vers un fluoroimmunocapteur à fibre optique
Thèse INPL-ENSIC-DCPR/GRAPP, Nancy

GRUSHKA E. [1974]

Bonded stationary phases in chromatography
Ann. Arbor Sci. Publ., Mich.

HAIR M.L. [1967]

"Infrared spectroscopy in surface chemistry"
Dekker, New-York

HALLER I. [1978]

Covalently attached organic monolayers on semiconductor surfaces
J. Am. Chem. Soc., **100**, 8050-8055

HOFMANN U., K. ENDELL, D. WILM [1934]

X-ray and colloid-chemical investigations on clay
Angew. Chem., **47**, 539-547

ILER R.K. [1979]

"The chemistry of silica : solubility, polymerization, colloid and surface properties and biochemistry"
J. Wiley & Sons, Chichester, England

ISHIDA H., J.L. KOENIG [1980]

A Fourier-transform infrared spectroscopic study of the hydrolytic stability of silane coupling agents on E-glass fibers
J. Polym. Sci. : Polym. Phys. Ed., **18**, 1931-1943

JÖNSSON U., M. MALMQVIST, I. RÖNNBERG [1985]_a

Immobilization of immunoglobulins on silica surfaces - Stability
Biochem. J., **227**, 363-371

JÖNSSON U., M. MALMQVIST, I. RÖNNBERG [1985]_b

Immobilization of immunoglobulins on silica surfaces - Kinetics of immobilization and influence of ionic strength
Biochem. J., **227**, 373-378

KALLURY K.M.R., P.M. MACDONALD, M. THOMPSON [1994]

Effect of surface water and base catalysis on the silanization of silica by (aminopropyl)alkoxysilanes studied by X-ray photoelectron spectroscopy and ¹³C cross-polarization/magic angle spinning nuclear magnetic resonance
Langmuir, **10**, 492-499

KAUTSKY H., A. HIRSCH [1935]

Detection of traces of oxygen by phosphorescence destruction
Z. anorg. allgem. Chem., **222**, 126-134

KAWABATA Y., K. TSUCHIDA, T. IMASAKA, N. ISHIBASHI [1987]

Fiber-optic pH sensor with monolayer indicator
Anal. Sci., **3**, 7-9

KENNEDY J.F., J.M.S. CABRAL [1983]

Immobilized enzymes
Chem. Anal., **66**, 283-391

KIRKLAND J.J., J.L. GLAJCH, R.D. FARLEE [1989]

Synthesis and characterization of highly stable bonded phases for high-performance liquid chromatography column packings
Anal. Chem., **61**, 2-11

KULP T.J., I. CAMINS, S.M. ANGEL, C. MUNKHOLM, D.R. WALT [1987]

Polymer immobilized enzyme optodes for the detection of penicillin
Anal. Chem., **59**, 2849-2853

KUMAR P., J.T. COLSTON, J.P. CHAMBERS, E.D. RAEL, J.J. VALDES [1994]

Detection of botulinum toxin using an evanescent wave immusensor
Biosensors and Bioelectronics, **9**, 57-63

LECKBAND D., R. LANGER [1991]

An approach for the stable immobilization of proteins
Biotechnology and Bioengineering, **37**, 227-237

LEGRAND A.P., H. HOMMEL, A. TUEL, A. VIDAL, H. BALARD, E. PAPIRER, P. LEVITZ, M. CZERNICHOWSKI, R. ERRE [1990]

Hydroxyls of silica powders
Adv. Colloid Interface Sci., **33**, 91-330

LE GRANGE J.D., J.L. MARKHAM, C.R. KURKJIAN [1993]

Effects of surface hydration on the deposition of silane monolayers on silica
Langmuir, **9**, 1749-1753

LEYDEN D.E., M.L. STEELE, B.B. JABLONSKI, R.B. SOMOANO [1978]

Structural studies of immobilized ethylenediamine as a preconcentrating agent for molybdate and tungstate
Anal. Chim. Acta, **100**, 545-554

LIN J.-N., J. HERRON, J.D. ANDRADE, M. BRIZGYS [1988]

Characterization of immobilized antibodies on silica surfaces
IEEE Trans. Biomed. Eng., **35**, 466-471

LOCHMUELLER C.H., D.R. WILDER [1979]

The sorption behavior of alkyl bonded phases in reverse-phase, high performance liquid chromatography
J. Chromatogr. Sci., **17**, 574-579

McDONALD R.S. [1958]

Surface functionality of amorphous silica by infrared spectroscopy
J. Phys. Chem., **62**, 1168-1178

- MACIEL G.E., D.W. SINDORF [1980]
Silicon-29 NMR study of the surface of silica gel by cross polarization and magic-angle spinning
J. Am. Chem. Soc., **102**, 7606-7607
- MAHIEUXE B. [1995]
Capteurs à fibre optique pour le dosage des nitrates
Thèse INPL-ENSIC-DCPR/GRAPP, Nancy
- MARSHALL D.B., C.L. COLE, D.E. CONNOLLY [1986]
Variable reactivity in the chemical modification of silica. Effects of initial deactivation on high-performance liquid chromatographic performance
J. Chromatogr., **361**, 71-82
- MENAWAT A., J. HENRY Jr., R. SIRIWARDANE [1984]
Control of surface energy of glass by surface reactions : contact angle and stability
J. Colloid Interface Sci., **101**, 110-119
- MIMMS L.T., M.A. McKNIGHT, R.W. MURRAY [1977]
Spectrophotometric study of coverage and acid-base equilibrium of a chemically bonded phase
Anal. Chim. Acta, **89**, 355-361
- MOSES P.R., L.M. WIER, J.C. LENNOX, H.O. FINKLEA, J.R. LENHARD, R.W. MURRAY [1978]
X-Ray photoelectron spectroscopy of alkylamine-silanes bound to metal oxide electrodes
Anal. Chem., **50**, 576-585
- OFFENBACHER H., O.S. WOLFBEIS, E. FÜRLINGER [1986]
Fluorescence optical sensors for continuous determination of near-neutral pH values
Sensors and actuators, **2**, 73-84
- OGASAWARA F.K., Y. WANG, D.R. BOBBITT [1992]
Dynamically modified, biospecific optical fiber sensor for riboflavin binding protein based on hydrophobically associated 3-octylriboflavin
Anal. Chem., **64**, 1637-1642
- PETIAUD R. [1994]
Caractérisation de silices greffées. Détermination des taux de greffage et étude des silanols après greffage par RMN sur solides du silicium
J. Chim. Phys., **91**, 895-900
- PETREA R.D., M.J. SEPANIAK, T. VO-DINH [1988]
Fiber-optic time-resolved fluorimetry for immunoassays
Talanta, **35**, 139-144
- REUTER A., K. HEGER, M. UHLIG, L. LIBERA, G. MARX [1994]
Chemical modification of silica surfaces
Fresenius J. Anal. Chem., **349**, 219-221
- RIEDO F., M. CZENCZ, O. LIARDON, E.Sz. KOVÁTS [1978]
Chemically modified silicon dioxide surfaces. Wetting properties of compact n-alkyl-dimethylsiloxy layers, and their mixed surface crystals. The question of wetting of molecularly rough and of swollen surfaces
Helv. Chim. Acta, **61**, 1912-1941

- ROUMELIOTIS P., K.K. UNGER [1978]
Structure and properties of n-alkyldimethylsilyl bonded silica reversed-phase packings
J. Chromatogr., **149**, 211-224
- SCHRADER M.E., A. BLOCK [1971]
Tracer study of kinetics and mechanism of hydrolytically induced interfacial failure
J. Polymer Sci. : Part C, **34**, 281-291
- SHARMA B.P., L.F. BAILEY, R.A. MESSING [1982]
Immobilized biomaterials - technology and applications
Angew. Chem., **94**, 836-852
- SIMKO S.J., M.L. MILLER, R.W. LINTON [1985]
Quantitative fast atom bombardment mass spectrometry of silylated silica surfaces
Anal. Chem., **57**, 2448-2451
- SINDORF D.W., G.E. MACIEL [1983]
Solid-state NMR studies of the reactions of silica surfaces with polyfunctional chloromethylsilanes and ethoxymethylsilanes
J. Am. Chem. Soc., **105**, 3767-3776
- SURMAN D.J., J.A. VAN DEN BERG, J.C. VICKERMAN [1982]
Fast atom bombardment mass spectrometry for applied surface analysis
SIA Surf. Interface Anal., **4**, 160-167
- SUTHERLAND R.M., C. DÄHNE, J.F. PLACE, A.S. RINGROSE [1984]
Optical detection of antibody-antigen reactions at a glass-liquid interface
Clin. Chem., **30**, 1533-1538
- SZABÓ K., N. LE HA, P. SCHNEIDER, P. ZELTNER, E. Sz. KOVÁTS [1984]
Monofunctional (dimethylamino)silane as silylating agent
Helv. Chim. Acta, **67**, 2128-2142
- TROMBERG B.J., M.J. SEPANIAK, T. VO-DINH, G.D. GRIFFIN [1987]
Fiber-optic chemical sensors for competitive binding fluoroimmunoassay
Anal. Chem., **59**, 1226-1230
- UNTEREKER D.F., J.C. LENNOX, L.M. WIER, P.R. MOSES, R.W. MURRAY [1977]
Chemically modified electrodes - Part IV. Evidence for formation of monolayers of bonded organosilane reagents
J. Electroanal. Chem., **81**, 309-318
- URBANO E., H. OFFENBACHER, O.S. WOLFBEIS [1984]
Optical sensor for continuous determination of halides
Anal. Chem., **56**, 427-429
- VACUS P. [1991]
Mise au point d'une nouvelle méthode optique pour la mesure de concentrations locales en phase liquide - Application au mélange dans une cuve agitée
Thèse INPL-ENSIC-LSGC-DCPR/GRAPP, Nancy
- VANDENBERG E., H. ELWING, A. ASKENDAL, I. LUNDSTRÖM [1991]
Protein immobilization to 3-aminopropyl triethoxy silane/glutaraldehyde surfaces : characterization by detergent washing
J. Colloid Interface Sci., **143**, 327-335

- VIVILECCHIA R.V., R.L. COTTER, R.J. LIMPET, N.Z. THIMOT, J.N. LITTLE [1974]
Considerations of small particles in different modes of liquid chromatography
J. Chromatogr., **99**, 407-424
- VRANCKEN K.C., P. VAN DER VOORT, I. GILLIS-D'HAMERS, E.F. VANSANT, P. GROBET [1992]
Influence of water in the reaction of γ -aminopropyltriethoxysilane with silica gel. A Fourier-transform infrared and cross-polarisation magic-angle-spinning nuclear magnetic resonance study
J. Chem. Soc. Faraday Trans., **88**, 3197-3200
- WANG D., F.R. JONES, P. DENISON [1992]
Surface analytical study of the interaction between γ -amino propyl triethoxysilane and E-glass surface. - Part I Time-of-flight secondary ion mass spectrometry
J. Mater. Sci., **27**, 36-48
- WEETALL H.H. [1975]
Dans "Enzymology : Immobilized enzymes, antigens, antibodies and peptides. Preparation and characterization"
Vol. 1, Dekker, New-York
- WEI M., R.S. BOWMAN, J.L. WILSON, N.R. MORROW [1993]
Wetting properties and stability of silane-treated glass exposed to water, air and oil
J. Colloid Interface Sci., **157**, 154-159
- WHITE R.L., A. NAIR [1990]
Diffusive reflectance infrared spectroscopic characterization of silica dehydroxylation
Appl. Spectrosc., **44**, 69-75
- WIJNEN P.W.J.G., T.P.M. BEELEN, K.P.J. RUMMENS, H.C.P.L. SAEIJS, J.W. DE HAAN, L.J.M. VAN DE VEN, R.A. VAN SANTEN [1991]
The molecular basis of aging of aqueous silica gel
J. Colloid Interface Sci., **145**, 17
- WILLIAMS R.A., H.W. BLANCH [1994]
Covalent immobilization of protein monolayers for biosensor applications
Biosensors and Bioelectronics, **9**, 159-167
- WILLIAMSON M.L., D.H. ATHA, D.J. REEDER, P.V. SUNDARAM [1989]
Anti-T2 monoclonal antibody immobilization on quartz fibers : stability and recognition of T2 mycotoxin
Anal. Lett., **22**, 803-816
- WIRTH M.J., H.O. FATUNMBI [1992]
Horizontal polymerization of mixed trifunctional silanes on silica : a potentiel chromatographic stationary phase
Anal. Chem., **64**, 2783-2786
- WIRTH M.J., H.O. FATUNMBI [1993]
Horizontal polymerization of mixed trifunctional silanes on silica. 2. application to chromatographic silica gel
Anal. Chem., **65**, 822-826
- WOLFBEIS O.S., H. OFFENBACHER, H. KRONEIS, H. MARSONER [1984]
A fast responding fluorescence sensor for oxygen
Mikrochim. Acta, **1**, 153-158

WRIGHTON M.A., R.G. AUSTIN, A.B. BOCARSLY, J.M. BOLTS, O. HAAS,
K.D. LEGG, L. NADJO, M.C. PALAZZOTTO [1978]

Design and study of a photosensitive interface : a derivatized n-type silicon photoelectrode
J. Am. Chem. Soc., **100**, 1602-1603

**AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE
DE LORRAINE**

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

**Monsieur REVILLON André, Directeur de Recherches CNRS,
CNRS/UPR 9031 Vernaison,**

**Monsieur GOURE Jean-Pierre, Professeur, Faculté des Sciences de
Saint-Etienne.**

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Madame DARNE - HOSOTTE Raphaëlle

à soutenir devant l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,
une thèse intitulée :

"Etude Photophysique des Transferts Pariétaux".

en vue de l'obtention du titre de :

**DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE
LORRAINE**

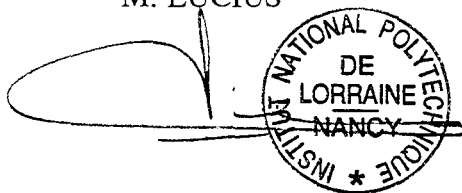
Spécialité : **"GENIE DES PROCEDES"**

**Service Commun de la Documentation
INPL
Nancy-Brabois**

Fait à Vandoeuvre le, **17 Juin 1996**

Le Président de l'I.N.P.L.,

M. LUCIUS



The image shows a handwritten signature in black ink, which appears to be 'M. Lucius'. To the right of the signature is a circular stamp. The stamp contains the text 'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE NANCY' around the perimeter, with a small asterisk at the bottom.

ABSTRACT

The research's aim is to develop a photophysical sensor for the study of mass transfer in gaz-liquid reactors. The principle is based on fluorescence quenching of molecules grafted on the sensor, by oxygen dissolved in water. Variations of fluorescence's intensity is a linear fonction of oxygen concentration, which one is related to mass transfer coefficient $k_L a$.

With this object, two main topics were developed :

- The realization and study of the grafting of a fluorescent molecule onto a plane silica surface : 4-(1-pyrenyl)butyric acid was chosen as the fluorophore for its high reactivity towards oxygen. Several immobilization conditions were tested in order to determine the influence of various parameters (water quantity, presence of catalysts, type of surface) and their actions were evaluated qualitatively (use of surface analysis technologies : fluorescence microscopy, scanning shear force microscopy, etc.) and quantitatively (fluorimetry). The use of a post-treatment, working on desorption, led to set up a kinetic model.
- The set up of the sensor : determination of the Stern-Volmer plot ($I = f([O_2])$) in static and dynamic environment and tests in gaz-liquid reactor allowed the calculation of $k_L a$.

RESUME

L'objectif de la recherche est la mise au point d'un capteur photophysique pour l'étude des phénomènes de transfert de matière en milieu biphasique gaz-liquide. Le principe repose sur l'inhibition de fluorescence de molécules greffées sur le capteur, par l'oxygène dissous dans l'eau. La variation d'intensité de fluorescence est une fonction linéaire de la concentration en oxygène, celle-ci étant elle-même reliée au coefficient de transfert volumique, $k_L a$.

Dans ce but, deux actions principales ont été développées :

- La réalisation et l'étude de la fixation chimique de la molécule fluorescente sur une surface plane en silice : l'acide 4-(1-pyrényl)butyrique a été choisi comme fluorophore pour sa forte réactivité vis-à-vis de l'oxygène. Différentes conditions de greffage ont été testées pour déterminer l'influence de divers paramètres (quantité d'eau, présence de catalyseur, type de surface) et leurs actions analysées de manière qualitative (utilisations de techniques d'analyse de surface : microscopie par fluorescence, microscopie à force atomique (de cisaillement ou de friction), etc.) et quantitative (fluorimétrie). L'utilisation d'un post-traitement, jouant sur la désorption, a permis de dégager un modèle cinétique.
- La mise au point du capteur : la détermination de la droite de Stern-Volmer ($I_f = f([O_2])$) en milieu statique et dynamique et les essais dans le milieu biphasique gaz-liquide ont permis de déterminer le coefficient $k_L a$.