



Capteurs chimiques à base de matrices nanoporeuses pour la détection de métabolites volatils de la tuberculose

William Bamogo

► **To cite this version:**

William Bamogo. Capteurs chimiques à base de matrices nanoporeuses pour la détection de métabolites volatils de la tuberculose. Chimie théorique et/ou physique. Université Paris Sud - Paris XI, 2015. Français. <NNT : 2015PA112010>. <tel-01128414>

HAL Id: tel-01128414

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01128414>

Submitted on 9 Mar 2015

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

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

UNIVERSITÉ PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE 470 :
CHIMIE DE PARIS SUD

THÈSE DE DOCTORAT

CHIMIE

par

William BAMOGO

Capteurs chimiques à base de matrices nanoporeuses pour la
détection de métabolites volatils de la tuberculose

Date de soutenance : 20/01/2015

Composition du jury :

Directeur de thèse :	Mme. Thu-Hoa TRAN-THI	Directrice de recherche, NIMBE, CEA Saclay
Rapporteurs :	Mme. Isabelle LERAY	Directrice de recherche, ENS Cachan
	M. Michel Wong Chi MAN	Directeur de recherche, ENSCM
Examineurs :	Mme. Isabelle LAMPRE	Professeure, LCP, Université Paris-sud
	Mme. Armelle NOVELLI-ROUSSEAU	Chercheur, bioMérieux SA
	M. Yves BIGAY	Président d'Ethera, Ethera SA

Remerciements

Un travail de thèse est présenté par un seul individu, mais est le résultat du concours d'un grand nombre de personnes. Il est le résultat de la mise en commun de l'énergie de nombreuses personnes pour permettre au doctorant d'arriver au bout car son énergie seule est insuffisante. Je remercie toutes les personnes ayant contribué de près ou de loin à ce travail de m'avoir apporté une aide précieuse.

Je remercie Mme. Dimitra Markovitsi, directrice du laboratoire Francis Perrin, et Mme. Cécile Reynaud, Directrice du Service des Photons, Atomes et Molécules, de m'avoir accueilli au sein du laboratoire et du service.

Je tiens à remercier Mme. Isabelle Leray, directrice de recherche à l'École Normale Supérieure de Cachan et M. Michel Wong Chi Man, directeur de recherche à l'École Normale Supérieure de Chimie de Montpellier d'avoir accepté de juger de ce travail et de participer à ce jury en tant que rapporteurs. Je remercie également Mme. Isabelle Lampre, professeure à l'Université Paris-Sud d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse. Sans M. Yves Bigay, président d'Ethera et initiateur de Covadis, ce projet n'aurait pas vu le jour et je le remercie doublement pour avoir aussi accepté de juger de ce travail. Mes remerciements vont aussi à Mme. Armelle Novelli-Rousseau, collaboratrice de bioMérieux, qui m'a proposé de réaliser des tests en milieux biologiques et d'avoir accepté d'être membre du jury de thèse.

Je voudrais exprimer ma reconnaissance à mes encadrants, Mme. Thu-Hoa Tran-Thi et M. Laurent Mughlerli. A Thu-Hoa, ma directrice de thèse, je ne saurais exprimer ma gratitude en quelques lignes. Merci de m'avoir permis d'effectuer ce travail de thèse, merci pour votre présence, votre expérience, vos conseils, votre patience pendant la période de rédaction. Je n'en serais pas là aujourd'hui si vous n'aviez pas été là. Merci infiniment.

Laurent, ton expérience et tes conseils m'ont beaucoup aidé, et ta disponibilité m'a été d'un grand secours. Merci également pour ton humour et les discussions sur les arts martiaux et sports de combat.

Je remercie M. Akos Banyasz, du groupe Biomolécules Excitées, pour avoir dégagé du temps sur son planning pour me permettre d'effectuer les mesures de durées de vie de luminescence et sa grande disponibilité pour les discussions. Je remercie M. Frédéric Mallard de bioMérieux. Les discussions avec lui et Armelle dans le cadre du projet ont toujours été enrichissantes.

Merci à Mmes. Caroline Lebe, Jacqueline Bandura et Véronique Gerecny pour leur aide dans la résolution de tous les problèmes administratifs, toujours dans la bonne humeur.

Merci à M. Dominique Porterat, ingénieur de sécurité du service, pour sa disponibilité et sa souplesse dans la résolution de nombreux problèmes que nous avons rencontrés. Un grand merci à Mme. Sylvie Jubera du service informatique pour sa grande disponibilité pour résoudre tous les problèmes informatiques et à Aurélie Habert pour l'envoi rapide des commandes de matériels.

Je remercie tous les collaborateurs d'Ethera, en particulier Ms. Emmanuel Chevallier et Thomas Caron, avec qui les rapports ont toujours été amicaux et pour les prêts de matériels, toujours accordés de bon cœur en échange de gâteaux au chocolat.

Un grand merci aux membres de l'équipe Capteurs Chimiques. A mes prédécesseurs, et aux membres de l'équipe que j'ai côtoyés au cours de ces trois années : merci à Charles dont le rôle au sein de l'équipe est indispensable et pour l'aide précieuse qu'il m'a apporté ; à Guillaume, le magicien des programmes Labview, sans qui certaines études n'auraient pas été possibles. Ton humour et ta « geekerie » ont été grandement appréciés ; merci à Sandrine pour son aide technique ; merci à Hieu, discret mais toujours serviable ; à Claire et ses « cagades », merci pour ta bonne humeur et ton humour ; à Florent « l'homme le plus classe du monde » et ses péripéties ; merci à Ana pour sa gentillesse ; merci à Eva, qui m'a nourri de « force » pendant la rédaction du manuscrit ; à Nassim, que la Force soit avec toi et ton dos ; à Nina qui n'a jamais eu de problèmes à répondre à mes questions « collector » ; à Ludovic et Philippe, le mangeur de frites (paraît-il...).

Un grand merci à M. Pascal Sénat, pour sa disponibilité lors de la conception de la cellule d'exposition. Merci à Ms. Didier Guyader et André Fillon de l'atelier mécanique, sans qui la fabrication de pièces mécaniques importantes n'aurait pas été possible. Merci à M. Bruno Coltrinari, le verrier, pour ses conseils lors de la conception et la fabrication de pièces de verrerie spécifiques et à M. Gilles Le Chevallier, pour son aide pour les problèmes électroniques. Je remercie M. Pascal Viel pour m'avoir autorisé l'accès au profilomètre. Merci également à M. Roland Sarda-Estève pour les essais de mesure d'acide nicotinique par PTR-MS.

Je remercie les collègues du groupe LEDNA, toujours aimables et disponibles, qui m'ont permis de leur emprunter du matériel ou un bout de paille lorsque cela a été nécessaire. Merci à M. Henri Perez, qui a souvent subi avec humour le bruit que je lui imposais en utilisant son bain à ultrasons ; Ms. Yann Leconte et Olivier Sublemontier m'ont accueilli dans le clan des coureurs et je les remercie pour ces moments de détente. Je remercie également les collègues doctorants et stagiaires du groupe pour les bons moments passés au laboratoire et en dehors : Harold, à qui je suis reconnaissant de m'avoir mis sur la voie de « l'âme sombre » ; Briac, pour son imagination florissante et décalée (j'attends le deuxième tome des aventures du biscuit vampire) ; Julien, pour son talent graphique évident (la version BD du biscuit vampire, on frôle le chef d'œuvre), Nicolas, Sarah, pour ne citer qu'eux.

Enfin je remercie mes parents, pour leur rôle fondamental dans mon existence.

Table des matières

INTRODUCTION	1
I. La tuberculose	1
I.1.1 Historique de la tuberculose	1
I.1.2 Origine de la tuberculose	1
I.1.3 Les différents types de tuberculose	2
I.1.4 Tuberculoses extra-pulmonaires	2
I.1.5 Tuberculose pulmonaire.....	2
II. La tuberculose dans le monde	2
II.1 La tuberculose pulmonaire en chiffres.....	2
II.2 Le contrôle de la tuberculose dans le monde	3
II.2.1 Aspects positifs.....	3
II.2.2 Aspects négatifs.....	3
III. Etat de l'art sur les méthodes de diagnostic	4
III.1 Définition du besoin	4
III.1.1 Cas particulier des jeunes enfants.....	4
III.1.2 Cas particulier des personnes co-infectées par Tb et HIV	4
III.1.3 Cas particulier des tuberculoses extra-pulmonaires	4
III.2 Les méthodes approuvées et conseillées par l'OMS.....	5
III.2.1 Les méthodes microscopiques	5
III.2.2 Les méthodes de cultures.....	6
III.2.3 Les méthodes moléculaires	6
III.3 Nouvelles approches en développement.....	11
III.3.1 L'analyse de composés volatils.....	11
III.3.2 L'analyse des composés volatils pour le diagnostic de la tuberculose.....	11
III.3.3 Miniaturisation	16
IV. Les objectifs du projet	17
Bibliographie.....	19
CHAPITRE I	22
I. Introduction.....	22
II. Propriétés des composés marqueurs de la tuberculose	22
II.1 L'acide nicotinique (AN)	22
II.1.1 Propriétés toxicologiques.....	24
II.1.2 Propriétés physico-chimiques à l'état fondamental et à l'état excité.....	24
II.2 Le nicotinate de méthyle (NM).....	25
II.2.1 Propriétés toxicologiques.....	26
II.2.2 Propriétés physico-chimiques	26
II.3 Le para-anisate de méthyle (pAM).....	27
II.3.1 Propriétés toxicologiques.....	28
II.3.2 Propriétés physico-chimiques	28
II.4 Le phénylacétate de méthyle (PM)	28
II.4.1 Propriétés toxicologiques.....	29
II.4.2 Propriétés physico-chimiques	29
II.5 Le 2-méthoxybiphényle (MB)	30
II.5.1 Propriétés toxicologiques.....	30

II.5.2	Propriétés physico-chimiques	30
	Bibliographie.....	32
	CHAPITRE II	35
I.	Introduction.....	35
II.	Choix de la molécule-sonde et réactivité en solution	35
II.1	Choix de la molécule-sonde	35
II.2	Complexation de l'acide nicotinique avec les lanthanides.....	36
II.3	Propriétés optiques du nitrate de terbium en solution	38
II.3.1	Propriétés optiques du nitrate de terbium à l'état fondamental	38
II.3.2	Propriétés optiques du nitrate de terbium à l'état excité.....	39
III.	Réactivité de la molécule sonde en solution.....	40
III.1	Propriétés optiques de $Tb(NO_3)_3$ et des complexes Tb^{3+}/AN	40
III.2	Dosage de l'acide nicotinique.....	52
III.2.1	Dosage de l'acide nicotinique dans les solutions diluées de $Tb(NO_3)_3$	53
III.2.2	Dosage de l'acide nicotinique dans les solutions concentrées de $Tb(NO_3)_3$	56
III.2.3	Mesures des durées de vie des complexes de Tb^{3+}	58
III.2.4	Comparaison avec les données de la littérature	62
IV.	Etude des interférences	64
IV.1	Etude spectrophotométrique des marqueurs.....	65
IV.2	Intensité de luminescence du nitrate de terbium en présence de chaque métabolite.....	65
IV.3	L'acide benzoïque : un analyte et interférent potentiel	70
IV.3.1	Caractéristiques spectrophotométriques de l'acide benzoïque	70
IV.3.2	Luminescence du nitrate de terbium et de son complexe avec l'acide nicotinique en présence d'acide benzoïque.....	71
V.	Milieus biologiques	72
V.1	Objectifs de l'étude	72
V.1.1	L'urine.....	72
V.1.2	La salive	72
V.1.3	Le condensat d'haleine.....	73
V.1.4	Préparation des échantillons.....	73
V.1.5	Analyse spectrophotométrique des échantillons.....	74
V.1.6	Influence du milieu biologique sur la luminescence de Tb^{3+} et la détection de l'acide nicotinique.....	74
VI.	Conclusion	76
	Bibliographie.....	78
	CHAPITRE III	81
I.	Introduction.....	81
II.	Synthèse des matrices nanoporeuses dopées de BBT par voie sol-gel.....	83
II.1	Le procédé sol-gel.....	83
II.2	Préparation des matrices dopées de BBT	85
III.	Caractérisations des matrices	86
III.1.1	Détermination des paramètres de porosité des monolithes	87
III.1.2	Mesures d'angle de contact sur monolithes	88
IV.	Expositions des matrices vierges et dopées de BBT.....	89
IV.1	Exposition statique	89

IV.1.1	Exposition d'une matrice de TMOS dopée de BBT à de la vapeur d'eau	89
IV.1.2	Exposition d'une matrice vierge TMOS/APTES 97/3 à de la vapeur d'eau	94
IV.1.3	Exposition d'une matrice TMOS/APTES 97/3 dopée de BBT à de la vapeur d'eau	96
IV.2	Expositions dynamiques	103
IV.2.1	Dispositif d'exposition en dynamique	103
IV.2.2	Evolution de l'équilibre acido-basique du BBT dans une matrice TMOS/APTES 97/3 exposée en mode dynamique à un flux d'Ar humide	105
IV.3	Expositions des matrices de TMOS/APTES 80/20 vierge et dopées de BBT	114
IV.3.1	Exposition statique	114
IV.3.2	Exposition dynamique de la matrice TMOS/APTES dopée de BBT	119
IV.4	Estimation de la répartition des molécules de BBT et d'eau dans les pores	123
V.	Comparaison avec les données de la littérature	128
VI.	Conclusion	130
	Bibliographie.....	133
	CHAPITRE IV.....	135
I.	Introduction.....	135
II.	Préparation des matrices nanoporeuses dopées de terbium.....	135
II.1	Préparation des monolithes	135
II.2	Préparation des couches minces.....	136
III.	Génération de mélanges gazeux calibrés d'acide nicotinique.	138
III.1	Génération par perméation de gaz	138
III.2	Génération par extraction gaz-liquide	140
III.2.1	Optimisation de la méthode.....	140
III.2.2	Choix du débit de gaz vecteur	141
III.2.3	Choix de la température de chauffage	142
III.2.4	Choix de la durée de bullage	143
IV.	Exposition de matrices à de l'acide nicotinique gazeux	143
IV.1	Exposition statique des matrices monolithiques dopées de $Tb(NO_3)_3$ et d'hexamine	143
IV.1.1	Mesures des intensités d'émission	143
IV.1.2	Mesures des durées de vie de luminescence.....	145
IV.2	Exposition dynamique de films minces à de la vapeur d'eau et à des mélanges gazeux humides calibrés d'acide nicotinique	150
V.	Comparaison avec les données de la littérature	153
VI.	Conclusion	155
	Bibliographie.....	157
	CONCLUSION GENERALE	160
	Annexes	165
	Liste des produits chimiques utilisés.....	165
	ANNEXE DU CHAPITRE II.....	166
I.	Etude de la complexation des marqueurs avec Tb^{3+} en solution	166
I.1	Mesures d'absorbance en solution	166
I.2	Mesures de luminescence avec le fluorimètre-phosphorimètre	166
I.3	Préparation des solutions de réactifs pour les mesures de luminescence de Tb^{3+} avec le fluorimètre-phosphorimètre.....	167
I.1	Détermination de la limite de détection de AN	170

I.1.1	Méthode de détermination de la limite de détection	170
I.1.2	Détermination de la limite de détection en solution d'hexamine 0,14 mol.L ⁻¹ avec une concentration de Tb ³⁺ de 200 μmol.L ⁻¹	171
I.1.3	Limite de détection en solution d'hexamine 0,14 mol.L ⁻¹ en utilisant une concentration de Tb(NO ₃) ₃ de 4 mmol.L ⁻¹	171
I.1.4	Limite de détection en solution d'hexamine 0,01 mol.L ⁻¹ en utilisant une concentration de Tb(NO ₃) ₃ de 200 μmol.L ⁻¹	172
I.2	Etude en milieux biologiques avec le fluorimètre-phosphorimètre Horiba/Jobin-Yvon	174
I.3	Préparation des solutions pour les mesures de durée de vie de Tb ³⁺ avec le dispositif de laser nanoseconde.....	174
I.4	Mesure de luminescence avec le dispositif laser nanoseconde.....	175
ANNEXE DU CHAPITRE III.....		177
II.	Exposition statique des matrices à de la vapeur d'eau saturante	177
II.1	Matrice TMOS/APTES 80/20 vierge.....	178
II.2	Matrice TMOS/APTES 80/20 dopée de BBT 4,5 10 ⁻⁴ mol.L ⁻¹	179
II.3	Principe de la détermination de la porosité par adsorption d'azote à la température de l'azote liquide.	180
II.4	Principe de la détermination de l'hydrophilie d'une surface par mesure de l'angle de contact d'une goutte sur la surface d'un matériau.....	184
ANNEXE DU CHAPITRE IV		187
I.	Exposition de matrices dopées de Tb(NO ₃) ₃ et exposition à des flux gazeux calibrés d'acide nicotinique.....	187
I.1	Matériel de génération par perméation de gaz	188

INTRODUCTION

I. La tuberculose

I.1.1 Historique de la tuberculose

Bien que l'origine de la tuberculose ne soit pas connue, cette maladie aurait déjà fait son apparition depuis l'Antiquité. Au V^{ème} siècle avant J.C., Hippocrate décrivait une affliction dont les symptômes ressemblaient fortement à ceux de la tuberculose. Des traces d'infections tuberculeuses ont été retrouvées sur des momies égyptiennes et des restes humains des premières civilisations précolombiennes. La tuberculose causait alors peu de décès dans le monde car la maladie ne pouvait se propager du fait de la grande dispersion des populations. Cependant l'urbanisation et l'avènement de l'ère industrielle aux XVIII^{ème} et XIX^{ème} siècle vont changer cet état de fait. Les fortes densités de population, la pauvreté, et les mauvaises conditions sanitaires et d'hygiène vont favoriser la transmission de la maladie. De ce fait, au XIX^{ème} siècle en Europe, près d'un quart de la population adulte meurt de la tuberculose. Il a fallu l'apparition de la théorie des germes infectieux au XIX^{ème} siècle pour avoir des avancées notables sur la compréhension de la maladie et la nature de sa propagation. En 1882, l'allemand Robert Koch met en évidence *Mycobacterium tuberculosis* comme agent infectieux de la tuberculose, qui sera nommée bacille de Koch. Les antibiotiques n'existant pas encore à cette époque, les traitements préconisés sont une exposition au soleil et à de l'air frais dans des sanatoriums. Enfin, en 1921, suite à la découverte de Koch et aux travaux d'Albert Calmette et Camille Guérin, le premier vaccin contre la tuberculose voit le jour, le BCG pour Bacille-Calmette-Guérin. La vaccination par le BCG devient obligatoire en France à partir de 1950. Entre temps, en 1946, la streptomycine, premier antibiotique antituberculeux, a été découverte. Plus tard, dans les années 1970, un second traitement anti-tuberculeux a été proposé. Il s'agit de la rifampin, un antibiotique permettant un traitement sur de courtes périodes. Grâce à la généralisation de la vaccination, à l'amélioration des conditions d'hygiène et à la découverte de ces traitements, la tuberculose a connu un net recul à partir des années 1950 dans les pays développées. Mais malgré ces mesures, la tuberculose n'a jamais été totalement éradiquée du fait de l'apparition de souches résistantes et d'un relâchement de la vigilance à partir des années 1990.

I.1.2 Origine de la tuberculose

La tuberculose est une maladie bactérienne. Elle est provoquée par la bactérie *Mycobacterium tuberculosis* et par des bactéries du complexe *Mycobacterium tuberculosis*. Sont désignées sous l'appellation complexe *Mycobacterium tuberculosis* les mycobactéries partageant le même matériel génétique que *Mycobacterium tuberculosis* et pouvant provoquer la tuberculose chez l'homme. Il s'agit de *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium bovis-BCG*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium canetti* et *Mycobacterium microti*. Ce sont des bactéries non aérobiques et non mobiles, ne formant pas de spores. Ces bactéries sont caractérisées par une croissance très lente. Dans un milieu de croissance solide, de type Lowenstein Jensen, il faut plus de 20 heures pour doubler la population bactérienne d'origine comparativement à 20 minutes pour *E.Coli*. Ce temps de génération entraîne un temps de croissance compris entre 3 et 8 semaines. Cette lente croissance est problématique pour un diagnostic rapide et le traitement de la maladie, puisqu'il faut beaucoup de temps pour identifier la maladie par les méthodes classiques de culture. Bien que la tuberculose

pulmonaire soit la forme de la maladie la plus connue car la plus répandue, il faut cependant noter qu'elle n'est pas l'unique manifestation de l'infection par le complexe *Mycobacterium tuberculosis*.

I.1.3 Les différents types de tuberculose

La tuberculose se manifeste par des symptômes variant suivant la localisation de l'infection bactérienne. Il existe deux types d'infections tuberculeuses : la tuberculose pulmonaire et les tuberculoses extra-pulmonaires. Les tuberculoses extra-pulmonaires regroupent les infections localisées hors des poumons, parmi lesquelles nous pouvons citer la tuberculose osseuse et la tuberculose cutanée. Si les symptômes diffèrent, toutes les infections tuberculeuses par *Mycobacterium tuberculosis* se caractérisent par l'inhalation ou l'ingestion d'expectorations infectées. La bactérie va ensuite se loger dans les poumons et se multiplier dans le tissu intra et extra cellulaire des poumons. Les bactéries présentes dans les cellules des poumons vont y rester, alors que les cellules s'étant multipliées extra-cellulairement vont infecter d'autres tissus, à la faveur du flux sanguin. On parle alors de tuberculose miliaire ou disséminée

I.1.4 Tuberculoses extra-pulmonaires

La **tuberculose osseuse** touche en premier lieu les grosses articulations (hanches, genoux) et la colonne vertébrale. Elle attaque l'os, le cartilage et la membrane synoviale, causant des douleurs et une réduction de la mobilité des articulations. La forme la plus répandue de tuberculose osseuse est la spondylite tuberculeuse, qui affecte la colonne vertébrale [1].

La **tuberculose cutanée** provoque des lésions de la peau. Les pathologies induites par la tuberculose cutanée entraînent la formation de granulomes, gonflements de la peau dus à l'accumulation de cellules immunitaires, et conduisant à une inflammation de la zone touchée dans le cas où l'infection induit une réponse immunitaire. C'est le cas lorsque le malade subit une réinfection par *Mycobacterium tuberculosis* ou la réactivation d'une infection latente. Les granulomes présentent donc une quantité plus ou moins élevée de l'agent infectieux, entouré par des lymphocytes. Le devenir des granulomes définit alors la pathologie. Dans le cas d'une primo infection par la bactérie, les symptômes sont principalement des nécroses non localisées, sans apparition de granulomes [2].

I.1.5 Tuberculose pulmonaire

Il s'agit de la forme la plus répandue dans le monde. La tuberculose pulmonaire affecte les poumons du malade. Elle provoque chez celui-ci une toux violente, qui peut l'amener à cracher du sang. Elle s'accompagne de douleurs dans la poitrine, de fièvre et d'une faiblesse de la personne.

II. La tuberculose dans le monde

II.1 La tuberculose pulmonaire en chiffres

Malgré des progrès obtenus au niveau du diagnostic et du soin de la tuberculose, 9 millions de nouveaux cas de tuberculose pulmonaire sont recensés chaque année et la maladie tue encore près de 1,4 millions de personnes par an. Parmi les 9 millions de nouveaux cas, 13 % soit près de 1 117 000 personnes sont également infectées par le VIH SIDA. La co-infection par le VIH tient également une grande part dans le nombre annuel de victimes puisque 430 000 personnes mortes de la tuberculose étaient également infectées par le virus du SIDA. Les principales zones géographiques touchées par la tuberculose sont l'Asie et l'Afrique : du fait de leur population élevée, le nombre de

personnes infectées en Chine et en Inde représente près de 40 % du total annuel. Cependant, le taux le plus rapide d'infection est rencontré en Afrique subsaharienne : il y est de 300 pour 100000 habitants contre 100 à 300 pour 100000 habitants en Asie. De plus c'est également en Afrique subsaharienne que le nombre de co-infection Tb-HIV est le plus élevé, puisque 60 % des cas y sont localisés, principalement en Afrique du Sud. Les cas d'infection par des souches résistantes ou extrêmement résistantes aux traitements représentent une part non négligeable des nouvelles infections et des décès annuels. En 2011, 60000 cas d'infections ont été reportés comme des infections par des souches multi-résistantes. Cependant ce nombre représenterait seulement 20 % du total des cas d'infections par des souches résistantes estimés dans le monde. Ce problème est pointé par l'organisation Mondiale de la Santé (OMS) en termes de contrôle de l'infection dans le monde et de difficulté de mise en œuvre de politiques globales.

II.2 Le contrôle de la tuberculose dans le monde

II.2.1 Aspects positifs

Le contrôle de la tuberculose passe par la mise en place de mesures techniques, diagnostic et soin des malades, qui doivent être couplées à des politiques d'actions à l'échelle mondiale pour implanter dans un maximum de pays les méthodes de diagnostic et de soins approuvées par l'OMS et favoriser le retour d'informations en vue d'améliorer ces mesures. La recrudescence de cas de tuberculose dans le monde et l'apparition de souches résistantes aux antibiotiques (MDR Tb : multi-drug resistant tuberculosis, ou XDR : extremely drug resistant tuberculosis) ont incité l'OMS à établir des directives visant réduire le nombre de cas de tuberculose. Ainsi depuis les années 1990, le nombre de nouveaux cas de tuberculose a diminué de près de 40 %, avec une diminution de 2,2 % pour la période 2010-2011. L'objectif visé est une diminution de 50 % de nouveaux cas d'ici 2050. Ces différentes politiques mises en place par l'OMS et suivies par un certain nombre de pays dans le monde ont permis un meilleur accès au soin. C'est ainsi qu'entre 1995 et 2011, 51 millions de personnes ont été traitées contre la tuberculose. Ces mesures ont également permis d'augmenter le taux de co-diagnostic Tb-HIV, notamment en Afrique subsaharienne, où il est passé de 3 à 69 %, ce qui a permis de sauver près d'un million de vie dans le monde entre 2004 et 2011. La recherche a également bénéficié de ces actions, l'OMS recensant près de 11 vaccins et médicaments en cours de développement. Le diagnostic n'est pas en reste non plus puisque ces dernières années ont vu le développement de nouvelles méthodes de diagnostic plus ou moins prometteuses, dont certaines ont officiellement été approuvées et plébiscitées par l'OMS, notamment le système Xpert MTB RIF qui sera abordé ultérieurement.

II.2.2 Aspects négatifs

Malgré les avancées décrites au paragraphe précédent, un certain nombre de freins à l'achèvement des objectifs fixés demeure. Le principal frein à une large expansion de ces mesures est financier. En effet, même lorsqu'un pays est signataire des demandes de l'OMS, sa marge de manœuvre est souvent limitée par les moyens financiers à sa disposition. Ce facteur est d'autant plus limitant dans des pays aux ressources financières limitées, notamment en Afrique et en Asie. Pour exemple, un texte de l'OMS stipule la présence d'au moins un laboratoire capable d'effectuer des analyses de crachats pour 100000 habitants dans les pays en développement. Sur les 22 pays ayant ratifié ce texte, seulement 15 ont été capables de le mettre en œuvre et d'arriver au nombre requis. Ces pays sont souvent tributaires des dons effectués pour soutenir leurs efforts. Très souvent, les sommes récoltées ne couvrent pas les besoins estimés. En 2012, l'OMS estimait à 8 milliards de

dollars par an les fonds nécessaires au soutien des actions menées dans les pays en voie de développement pour la période 2013-2015. Seulement 5 milliards de dollars ont été réunis pour mener à bien ces actions. Ce manque de moyens matériels entraîne également des problèmes organisationnels. Le manque de moyens financiers impacte également la recherche. L'OMS estime à 2 milliards de dollars par an les fonds nécessaires au développement de nouveaux vaccins, traitements et méthodes de diagnostic. En 2010, une estimation révélait que seulement 600 millions de dollars avaient été investis pour mener à bien ces recherches. L'impact est particulièrement important sur la recherche de méthodes de diagnostic adaptées aux populations les plus fragiles des pays en voie de développement, zones pour lesquelles le diagnostic est le point le plus critique pour une gestion efficace de la propagation de la maladie.

III. Etat de l'art sur les méthodes de diagnostic

III.1 Définition du besoin

L'analyse microscopique des crachats et la culture des bactéries, qui sont les deux méthodes de détection les plus répandues de diagnostic, s'avèrent ne pas être toujours bien adaptées selon les populations de malades.

III.1.1 Cas particulier des jeunes enfants

Les enfants d'âge inférieur à 15 ans atteints par la tuberculose forment une population particulière de malades. Tout d'abord, ces enfants ont plus de probabilités de développer une forme mortelle de la tuberculose, qu'elle soit pulmonaire ou extra-pulmonaire (ex : tuberculosis meningitis) du fait de leur système immunitaire moins mature. Pour la même raison, l'infection par la bactérie se traduit plus rapidement par la déclaration de la maladie : chez des enfants de 2 ans et moins, la maladie peut se déclarer en 12 mois [3]. La charge bactérienne responsable des symptômes est plus faible chez l'enfant que chez l'adulte. Ceci est traduit par un comptage plus faible des bactéries dans les échantillons de crachat récupérés auprès des enfants entraînant des faux résultats négatifs. C'est pour ces raisons que le diagnostic de la tuberculose infantile est plus généralement basé sur l'observation aux rayons X des poumons des patients, complétée par une culture des bactéries.

III.1.2 Cas particulier des personnes co-infectées par Tb et HIV

Le diagnostic de la tuberculose pour la population co-infectée Tb-HIV représente un autre défi. Du fait de la co-infection par le HIV, la charge bactérienne responsable du déclenchement de la maladie est beaucoup plus faible que chez des individus seulement infectés par *Mycobacterium tuberculosis*. Ceci se traduit par des faux négatifs plus fréquents que chez des patients uniquement atteints par la tuberculose (55 % contre 60-70 % chez les patients mono-infectés).

III.1.3 Cas particulier des tuberculoses extra-pulmonaires

Du fait de l'aspect moins fréquent et de la variété des zones touchées, la détection des tuberculoses extra-pulmonaires pose le problème de la spécificité des méthodes. Etant donné le nombre et la pluralité des symptômes, la mise au point de méthodes de détection spécifique à chaque pathologie n'est pas rationnellement envisageable. Le diagnostic d'une tuberculose extra-pulmonaire est également basé sur la combinaison de méthodes de détection. Cependant, à l'heure actuelle, très peu de méthodes permettent la détection de tuberculose extra pulmonaire.

Les recherches visant à la mise au point de méthodes de diagnostic de la tuberculose ont donné lieu à la publication d'un grand nombre de résultats de travaux, voire à la commercialisation

des systèmes évoqués. Ces résultats sont étudiés et évalués par l'OMS qui donne ainsi des recommandations officielles sur l'utilisation ou non des méthodes mises au point. Dans la suite, seront évoquées dans un premier temps les méthodes approuvées et conseillées par l'OMS puis celles en développement.

III.2 Les méthodes approuvées et conseillées par l'OMS

III.2.1 Les méthodes microscopiques

L'observation microscopique des crachats est la méthode la plus utilisée dans les pays en voie de développement pour le diagnostic de la tuberculose. L'observation des mycobactéries au microscope est précédée d'une étape de coloration. Cette dernière consiste à traiter l'échantillon en suivant un protocole défini permettant la fixation des colorants dans la paroi cellulaires des bactéries.

La méthode de coloration de référence a longtemps été la coloration de Ziehl-Neelsen. Elle consiste en premier lieu à appliquer un colorant concentré à chaud, puis à effectuer une décoloration par un acide fort puis à ajouter un alcool concentré pour recolorer les bactéries avec un second colorant. Cette méthode de diagnostic présente l'avantage d'une utilisation simple et rapide, les résultats étant obtenus dans la journée en quelques heures. Un microscopiste entraîné pourrait lire 25 à 30 lames par jour. Le coût modique d'un microscope en fait une méthode de choix pour le diagnostic dans les pays en voie de développement. Cependant du fait de sa faible sensibilité, la méthode permet la détection de 60% des cas d'infections, et n'est applicable que pour des échantillons ayant une forte charge bactérienne, ce qui la rend inadéquate pour le diagnostic de la tuberculose chez les enfants et les personnes atteintes par le VIH. Des études ont été menées pour tenter de palier à certains de ces inconvénients, notamment en ce qui concerne la sensibilité. Les améliorations de procédés ont porté à la fois sur le traitement chimique des échantillons par la mise au point de nouvelles méthodes de coloration et sur des traitements physiques tels que la centrifugation.

Le développement de la microscopie de fluorescence a permis un gain de sensibilité de 10 % selon certaines références [4], mais surtout un gain de temps non négligeable. La "coloration" consistant à lier des colorants fluorescents à la paroi cellulaire des bactéries, est effectuée en une seule étape [5]. Ces deux améliorations permettent de doubler le nombre de lames examinées de 25-30 à 60 par jour. Néanmoins, le coût de fonctionnement de l'appareillage et du matériel nécessaire à l'emploi de la microscopie de fluorescence (durée de vie des lampes classiques, besoins énergétiques) limite son utilisation aux laboratoires des pays développés ou aux centres de microscopie des grandes villes des pays en voie de développement. Ces inconvénients ont mis en évidence la nécessité de réduire l'impact matériel et énergétique de la méthode pour la rendre accessible au plus grand nombre. Des recherches plus poussées ont conduit au développement de la microscopie de fluorescence à diodes électroluminescentes. La durée de vie des DEL est plus élevée que celle des lampes classiques, ce qui réduit leur maintenance. Requérant une puissance plus faible, les besoins énergétiques sont réduits. Le matériel plus simple rend la méthode plus robuste et utilisable dans des conditions plus difficiles que celles requises par la microscopie de fluorescence classique, permettant son utilisation dans des centres de soins isolés. Ces améliorations en termes de robustesse et de transférabilité ont incité l'OMS, par l'intermédiaire de la Fondation pour de Nouveaux Diagnostics Innovants (FNDI, en anglais FIND) à encourager le développement de cette

technologie pour augmenter son impact dans les pays en voie de développement. Cependant des problèmes de sensibilité demeurent, limitant l'utilisation de la technique à des échantillons de charges bactériennes élevées, ce qui exclue les enfants et les personnes atteintes du VIH. De plus, la technique ne permet pas la détection des tuberculoses extra-pulmonaires.

III.2.2 Les méthodes de cultures

Méthode de diagnostic de référence, la culture de bactéries est la technique la plus sensible et la plus spécifique pour la détection de la tuberculose. C'est une technique versatile. Son utilisation est nécessaire pour mener des tests d'identification des souches bactériennes, de susceptibilité des bactéries vis-à-vis des antibiotiques et les bactéries cultivées peuvent servir à l'utilisation d'autres méthodes de diagnostic telles que l'empreinte génétique. Néanmoins, la méthode souffre d'un inconvénient majeur : le temps d'obtention de colonies viables.

Sur les milieux nutritifs solides de référence, le milieu Lowenstein-Jensen et le milieu Middlebrook 7h9, le développement des bactéries en colonies viables prend entre 2 et 8 semaines. De tels délais limitent fortement l'impact de la méthode sur le traitement des patients. De plus le coût de ces milieux nutritifs limite leur utilisation aux laboratoires des pays développés ou aux laboratoires de référence des pays en développement. Un milieu à base d'agarose et de sang de mouton, destiné à être plus abordable, a été développé [6]. La culture de bactéries sur ce milieu permet l'obtention d'un même niveau de développement bactérien que sur les deux milieux de référence en moins de temps. Drancourt et al. [5] ont montré qu'après une période de deux semaines, le nombre de colonies obtenues sur le milieu sang/agarose était de 1049 contre 621 pour les milieux à base d'oeufs, comme le Lowenstein-Jensen.

Mycobacterium tuberculosis a un développement plus rapide en milieu liquide que sur un milieu nutritif solide. Les premières recherches ont donc été orientées vers le développement de milieux de culture. Plusieurs systèmes commerciaux ont été mis au point : les systèmes Bactec 960 MGIT de Becton Dickinson, le système BacT Alert de bioMérieux ou le Myco-ESP culture System II de Trek Diagnostic system. Le système Bactec 960 MGIT signale le développement bactérien par l'apparition d'une luminescence : un complexe de ruthénium penta-hydraté est emprisonné dans un polymère de silicone disposé au fond des tubes de cultures contenant le milieu liquide. La luminescence du complexe de ruthénium est désactivée par l'oxygène. Aucune luminescence du complexe n'est observée au départ. Lors du développement bactérien, les bactéries consomment l'oxygène présent dans le milieu et produisent du dioxyde de carbone. La concentration d'oxygène dissous diminuant, le phénomène de quenching diminue et la luminescence du complexe augmente à mesure que le développement bactérien se poursuit. Selon une étude de Chihota et al.[6], la culture en milieu liquide utilisant le système Bactec 960 conduit à un meilleur rendement de croissance, avec un temps de développement de 14 jours au lieu 25 pour des cultures sur milieux solides Lowenstein Jensen ([7]). Le système BacT/Alert combine la culture de bactéries en milieu liquide à la détection du dioxyde de carbone produit par le métabolisme des bactéries. La culture en milieu liquide, en plus de sa rapidité, présente l'avantage supplémentaire d'être totalement automatisable, éliminant ainsi le besoin d'opération humaine, limitant les risques de contamination des échantillons et du personnel.

III.2.3 Les méthodes moléculaires

Les méthodes moléculaires sont basées sur le principe de l'amplification d'ADN. La réaction en chaîne par polymérase (PCR : polymerase chain reaction) est la méthode d'amplification la plus

connue. L'amplification d'ADN par réaction en chaîne a été mise au point en 1985 par Kary Mullis. Il s'agit de mettre en présence en solution la portion d'ADN à copier, des nucléotides et des amorces. Les amorces sont des séquences spécifiques des extrémités de la séquence d'ADN cible. Les amorces se lient aux extrémités de chaîne et la duplication se propage alors à partir des amorces jusqu'à l'autre extrémité. Les copies de la séquence ainsi obtenues servent ensuite de modèle pour la poursuite de la duplication. La réaction se déroule en trois étapes. Dans un premier temps le milieu réactionnel est chauffé aux alentours de 90°C pour provoquer la séparation des deux brins d'ADN. Il s'agit de l'étape de dénaturation. Ensuite deux amorces vont se lier chacune à une extrémité d'un des brins d'ADN. C'est l'étape d'hybridation. La troisième étape est l'élongation, qui consiste en l'hybridation des autres nucléotides présents dans le milieu sur chaque brin d'ADN, à la suite des amorces, grâce à l'enzyme ADN polymérase. Une fois les brins dupliqués, un nouveau cycle commence, générant de multiples répliques de la séquence d'ADN recherchée.

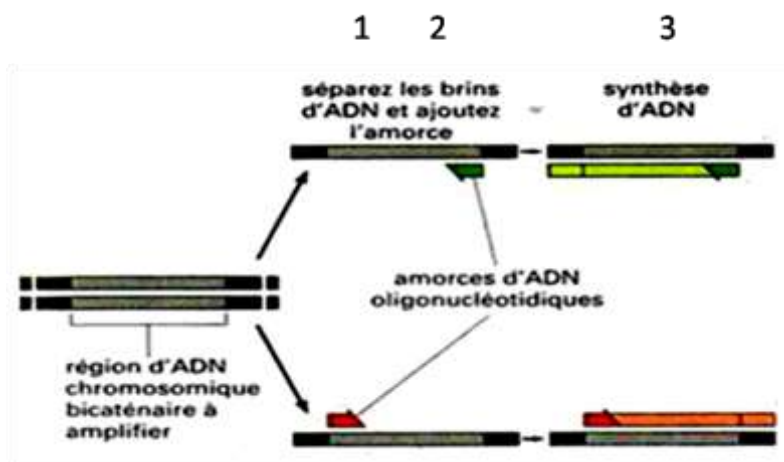


Figure 1. Schéma d'un cycle d'amplification d'ADN. Sur le schéma, 1 : dissociation du brin d'ADN, 2 : hybridation des amorces, 3 : synthèse d'ADN. <http://police-scientifique.webnode.fr/la-methode-pcr/>

Dans les premiers temps de sa création, le processus d'amplification était manuel. Des réactifs devaient être ajoutés à la fin de chaque cycle pour le suivant, rendant l'opération longue et fastidieuse. Les avancées technologiques ont permis une automatisation de la procédure, raccourcissant le temps d'amplification et éliminant plus ou moins complètement les opérations humaines. De nombreux systèmes existent et ont été commercialisés, mais le seul recommandé par l'OMS est le système Gene Xpert MTB RIF de la société Cepheid.

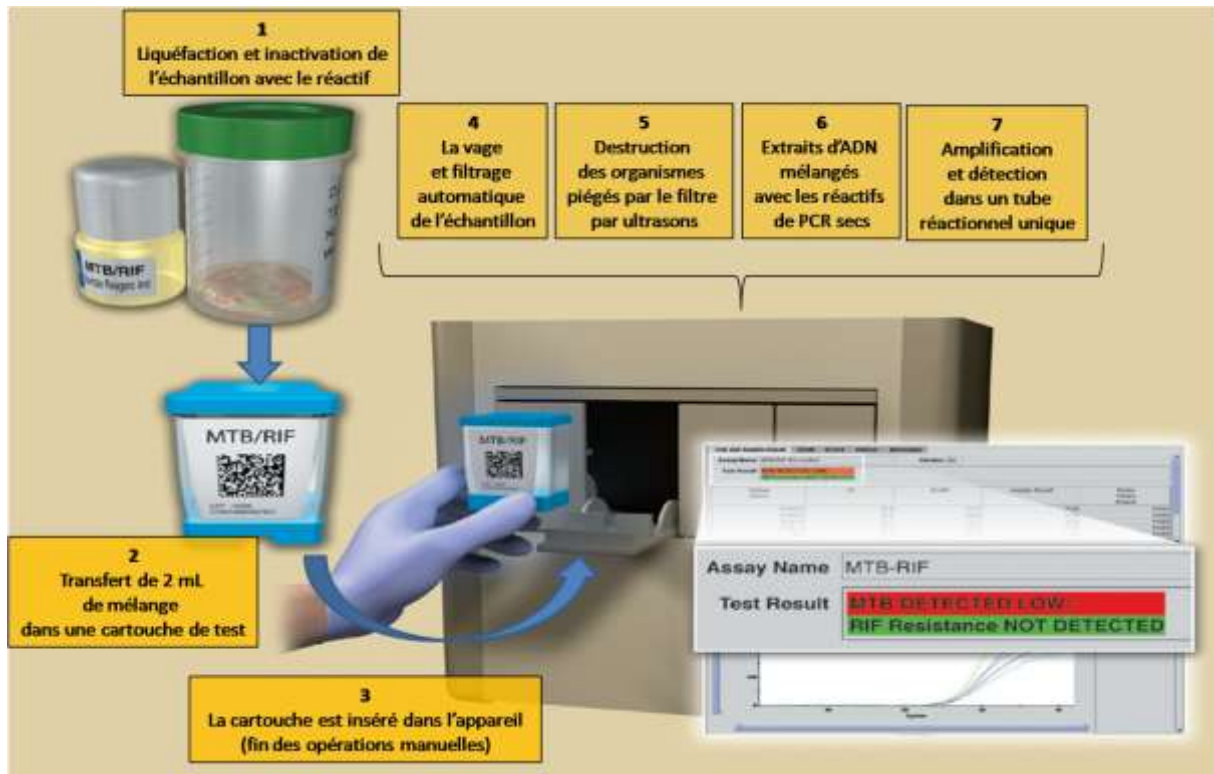


Figure 2. Schéma d'utilisation du Gene Xpert MTB/RIF.

Le Gene Xpert MTB RIF est un système automatisé d'amplification d'ADN bactérien à partir de crachats des patients. Il permet la détection du bacille de la tuberculose et signale si la souche détectée présente une résistance à l'antibiotique rifampicin. Le fonctionnement du système est séparé en deux étapes. La première étape est le traitement de l'échantillon. Un volume d'échantillon de crachats prélevé est mélangé à deux volumes de réactifs. Le mélange est ensuite agité brièvement puis mis en incubation pendant 15 minutes à température ambiante et agité de nouveau après incubation. Cette étape sert à liquéfier et inactiver l'échantillon de crachats. 2 mL du mélange sont ensuite introduits dans une cartouche spécialement prévue et la cartouche est introduite dans l'appareil. A partir de ce moment, tout est fait automatiquement. Le système fournit un résultat confirmant la présence ou non de *Mycobacterium tuberculosis* et la détection d'une résistance à la rifampicin en 1h45. La durée totale de la procédure est de 2 h.

Les méthodes d'amplification de l'ADN bactériens se sont révélées de loin les plus efficaces en termes de spécificité et de simplicité d'utilisation. Cependant, le principal frein au déploiement de cet appareil à travers le monde est son coût. En effet, Boehme et al. [8] ont estimé le prix du système seul à près de 17000 \$. Mais une estimation plus poussée du coup d'achat et de fonctionnement du système pour une année a également été menée par l'OMS (Planning for the implementation of new diagnostic tests ppt). Les résultats sont présentés dans le tableau 1.

Tableau 1. Estimation du coût d'achat et de fonctionnement annuel du gene Xpert MTB/RIF pour un laboratoire d'un pays en voie de développement.

	Catégorie	Item	Coût: \$	Commentaire
A	Equipement	Gene Xpert 4 module + ordinateur	17 500	- 60 % du pour les pays en voie de développement (PED)
B		Frais d'envoi	1 000	fonction de la destination
C		Fourniture d'énergie	1 000	prix dépendant du marché
D		imprimante	200	Achat sur place, prix dépendant du marché, optionnelle
E	Maintenance	Calibration annuelle	1 800	Tarif le plus élevé quand effectuée dans les locaux de Cepheid Toulouse, diminuée à 450 \$ quand effectuée sur le web
F	Consommables	cartouche	9,98	- 85 % pour les PED
G		Nombre de jour de travail par an	250	Fonction du pays
H		Nombre de tests moyen / jour	12	Fonction du pays
I		Nombre de tests / an	3000	G*H
J		Pertes dues à erreurs/utilisation incorrecte (estimation maximale de 10%)	300	10% de I
K	Ressources humaines	Salaire annuel du technicien	5 000	Fonction du pays
L		Formation à l'utilisation et assistance technique	5 000	Fonction des besoins
M	Coûts d'installation		19 700	A + B+ C + D
N	Coûts de fonctionnement annuel pour 1 appareil		34 734	E + F(I + J)
O	Total		64 434	N + M + L + K

Les coûts estimés par l'OMS et présentés dans ce tableau tiennent compte d'une réduction du coût d'achat du Gene Xpert MTB/RIF convenue par le FIND avec le fabricant en vue de faciliter l'accès de cette technologie aux laboratoires des pays en voie de développement. Ces résultats indiquent un coût annuel d'utilisation du système de 34734 \$. En tenant compte d'un nombre d'analyses de 3000 par an, le coût d'une analyse peut être estimé à $34734/3000 = 11,57$ \$. Une étude de Chihota et al. [7] menée en Afrique du Sud, comparant les performances et le coût des cultures solides sur milieu Lowenstein Jensen et en milieu liquide de type MGIT, indique un coût de 12,35 \$ pour la culture sur milieu et de 16,62 \$ pour la culture en milieu liquide. Bien que le coût d'une analyse utilisant le Gene Xpert apparaisse plus faible que le coût d'une culture, que ce soit en milieu solide ou liquide, il est important de tenir compte du fait que l'analyse de coût de l'OMS ne tient pas compte de l'impact des installations sur le coût du système, ce qui a été fait dans l'étude de Chihota. Une étude de Whitelaw et al. indique un coût d'analyse de 1,63 \$ en utilisant la microscopie de fluorescence à DEL et de 2,63 \$ pour la microscopie avec coloration de Ziehl-Neelsen [9]. Il ressort de ces données que la microscopie est la méthode la moins onéreuse. Les techniques de culture ont un coût d'analyse comparable à celui du Gene xpert. Le système Gene xpert permet la détection de *Mycobacterium tuberculosis* et indique également si la souche de la bactérie détectée possède une mutation conférant une résistance du bacille à la rifampicine. Il s'agit d'une méthode directe, le résultat de l'analyse étant obtenu à partir d'un échantillon biologique brut. Il existe cependant d'autres méthodes moléculaires approuvées par l'OMS poursuivant le même objectif mais fonctionnant différemment.

Les LPA ou Line Probe Assays désignent une autre catégorie de méthode moléculaire de détection. Les LPA sont des méthodes moléculaires de détection permettant de déterminer la

présence d'allèles¹ mutés, conférant une résistance aux antibiotiques, dans le génome d'une souche de *Mycobacterium tuberculosis*. Contrairement aux méthodes moléculaires classiques comme le Gene Xpert, la détection de résistances est l'unique utilisation destinée des LPA.

Les LPA sont des méthodes d'amplification d'ADN ciblées. La localisation sur les gènes des mutations pouvant conférer une résistance aux antibiotiques à *Mycobacterium tuberculosis* est connue. Les LPA consistent à amplifier spécifiquement des séquences génétiques particulières pour y détecter la présence d'une mutation. La méthode d'amplification est identique à une amplification par réaction en chaîne. La différenciation a lieu au moment de l'étape d'hybridation. Alors que lors d'une séquence de PRC, toutes les étapes, y compris l'hybridation ont lieu en phase aqueuse, lors d'un test par LPA, les séquences hybridées sont piégées sur une bande de papier recouverte de réactifs. Les réactifs présents sur les bandes de papier réagissent avec les brins d'ADN dupliqués et forment des bandes de couleurs différentes suivant que les séquences détectées correspondent à un gène natif ou un allèle muté. Les résultats peuvent être interprétés visuellement ou par l'intermédiaire d'une machine dédiée. Ces tests peuvent être effectués à partir des crachats ou de culture. Le développement des LPA a été soutenu par l'OMS en tant que méthode alternative de détection de souches tuberculeuses résistantes. Ils servent de compléments à une analyse par culture ou par microscopie et ne sont pas destinés à remplacer les tests de susceptibilité à partir de culture, mais doivent permettre de diminuer le nombre de culture requis pour effectuer ces tests.

Différents systèmes ont été développés à partir de cette technologie. Les deux systèmes actuellement présents sur le marché sont le Inno LIPA Rif TB de la société belge Innogenetics et le système Genotype MTBDRplus de la société allemande Hain Lifescience. Une étude menée par l'OMS a permis d'évaluer les coûts d'analyse liés à l'utilisation de cette méthode. Une réduction du coût d'analyse de 30 à 50% par rapport à une analyse par culture classique peut être obtenue en utilisant le test par LPA, suivant que le test est utilisé sur échantillon issu de culture bactérienne ou sur des crachats. Une estimation plus précise menée en Chine et en Inde a permis d'évaluer le coût d'une analyse par LPA à environ 10 dollars. L'approbation de la méthode par l'OMS a conduit à la négociation d'offre de prix entre le FNDI et la société Hain Lifescience pour permettre son accès aux pays les moins favorisés.

La catégorie de LPA évoquée plus haut permet la détection de résistances aux antibiotiques de première ligne, la rifampicine, l'isoniazid et l'éthambutol. En cas de résistance à ces médicaments des antibiotiques de seconde ligne sont utilisés, comme les fluoroquinones et les aminoglycosides. Une deuxième catégorie de LPA permet de détecter les résistances aux antibiotiques de seconde ligne. Le système MTBDRsl de Hain Lifescience a été créé pour inclure la détection de souches résistantes aux antibiotiques de seconde ligne.

Les équipements et infrastructures nécessaires à la mise en œuvre des LPA ainsi que leur coût limitent leur utilisation aux laboratoires de référence.

Les méthodes de détection moléculaires représentent une avancée majeure dans le diagnostic de la tuberculose. Leur sensibilité tend à égaler celle de la culture bactérienne, tout en permettant l'obtention d'un résultat fiable dans la journée plutôt que plusieurs semaines. Elles surpassent également l'analyse microscopique en termes de performance, bien cette dernière soit devenue moins chronophage. De plus comme c'est le cas avec le système Gene Xpert, l'utilisateur n'a besoin que d'un entraînement basique à l'utilisation de l'appareil pour effectuer les analyses.

¹ Allèle : l'une des versions d'un gène portée par un chromosome.

Néanmoins, et malgré les accords de l'OMS avec les fabricants, les méthodes moléculaires restent tout de même un investissement conséquent, non seulement pour l'achat du système, mais également pour la mise en place des infrastructures nécessaires à leur utilisation. Bien que le système Gene Xpert tende à supplanter la microscopie dans un certain nombre de pays comme nouvelle méthode privilégiée, le coût de ce système et des systèmes similaires incite à l'amélioration des méthodes existantes.

III.3 Nouvelles approches en développement

III.3.1 L'analyse de composés volatils

L'analyse des composés volatils dans l'air exhalé représente une nouvelle approche prometteuse dans le cadre d'un diagnostic médical peu coûteux et non invasif. Des essais cliniques utilisant des méthodes standards d'analyse de mélanges gazeux volatils, la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse, ont montré le potentiel de l'analyse des composés volatils de l'air exhalé pour le diagnostic du cancer du poumon [10], la maladie de Parkinson [11] ou le diabète [12].

L'analyse des composés volatils dans le cadre du diagnostic médical repose sur le principe de la détection de composés volatils, marqueurs spécifiques d'une maladie. Deux voies biologiques sont à l'origine de l'émission de ces marqueurs : i) des modifications métaboliques et un stress oxydatif (déséquilibre entre la proportion d'espèces réactives de l'oxygène et la proportion d'antioxydants dans le corps qui conduit à la dégradation des cellules par les radicaux libres) associés à la maladie peuvent induire des modifications du contenu en composés volatils du sang. Ces composés volatils peuvent ensuite être retrouvés dans d'autres fluides biologiques ; ii) des composés volatils spécifiques d'un pathogène peuvent être émis et se retrouver dans le sang. Comme pour la première voie d'émission, ces composés peuvent ensuite être retrouvés dans d'autres fluides biologiques, l'urine, la salive, la sueur et l'air expiré.

III.3.2 L'analyse des composés volatils pour le diagnostic de la tuberculose.

L'analyse des composés volatils pour le diagnostic de la tuberculose pourrait offrir une alternative particulièrement intéressante dans les pays où la maladie sévit le plus. La validité de cette approche dans le cadre du diagnostic de la tuberculose est appuyée par des études montrant que des rats ou des abeilles entraînées peuvent distinguer des crachats provenant d'individus sains des crachats d'individus malades [13, 14] [15]. Mais le développement de méthodes de diagnostic basées sur ce principe se révèle particulièrement compliqué. La principale difficulté provient du choix des composés volatils à considérer comme des marqueurs. Comme évoqué précédemment, les composés volatils détectés peuvent provenir de la réaction immunitaire du sujet à l'infection ou du pathogène lui-même. D'une part, le pathogène est une espèce minoritaire dans l'organisme du malade, et les composés volatils émis se trouvent alors dilués parmi les composés émis par l'organisme du malade. D'autre part, étant donnée la variabilité biologique entre les individus, les composés volatils issus de la réaction immunitaire seront différents ou dans des proportions différentes d'un individu à l'autre.

Une des contraintes de la méthode est la nécessité de connaître la composition moyenne de l'air exhalé [16]. Même dans ces conditions, la distinction peut être difficile à effectuer. Une démarche idéale combinerait l'analyse des composés volatils émis par des cultures de bactéries pour connaître les marqueurs volatils spécifiquement émis par *Mycobacterium tuberculosis*, à l'analyse

des composés volatils détectés dans le type d'échantillons choisis. Cette démarche permettrait de mieux cibler la nature de l'analyte recherché dans l'échantillon à tester. Syhre et al. [17] de l'Université d'Otago, ont montré que quatre composés volatils spécifiques peuvent être détectés dans l'espace de tête de culture de *Mycobacterium tuberculosis* et *Mycobacterium bovis*, responsables de la tuberculose bovine. Les bactéries ont été cultivées à partir de trois milieux de culture : deux milieux solides, Lowenstein-Jensen/Glycérol et agarose/sang de mouton et un milieu liquide, le BacT alert MP. Les quatre composés détectés sont le nicotinate de méthyle, le p-anisate de méthyle, le phénylacétate de méthyle, le 2-méthoxy biphényle. Parmi ces 4 composés, seuls le nicotinate de méthyle et le p-anisate de méthyle se sont avérés spécifiques des souches provoquant la tuberculose humaine et bovine, *Mycobacterium tuberculosis* et *Mycobacterium bovis*.

Une seconde étude de l'équipe d'Otago a porté sur la détection de l'acide nicotinique [18], connu comme étant un composé marqueur spécifique émis par des cultures de *mycobacterium tuberculosis*. Ce composé étant très peu volatil, les auteurs ont procédé à l'estérification du composé en nicotinate de méthyle pour le rendre plus volatil. La collecte et l'analyse des composés volatils présents dans l'haleine de malades de la tuberculose ont permis de montrer la présence de nicotinate de méthyle en proportion plus importante que chez des individus sains. Cependant, bien que des différences significatives entre individus sains et individus malades aient été observées, les auteurs ont montré que les concentrations de nicotinate de méthyle détectées étaient de l'ordre du femtomol/mol, soit du ppq. Les concentrations d'acide nicotinique seraient de l'ordre de quelques dizaines à quelques centaines de ppq (partie par quadrillion). En supposant que le nicotinate de méthyle détecté comprenne à la fois le nicotinate de méthyle effectivement présent dans le souffle des malades et l'acide nicotinique converti, il apparaît évident que la détection du nicotinate de méthyle ou de l'acide nicotinique seul reste un défi. Les auteurs ont eux-mêmes avoué que ces concentrations sont à la limite des capacités de leur système analytique.

Dans une étude traitant également les composés volatils émis par des cultures de mycobactéries, Nawrath et al. [19] ont étudiés l'influence du milieu de culture sur la composition du mélange de composés volatils émis par les bactéries. Les bactéries ont été cultivées sur un milieu de culture solide, le milieu Middlebrook 7H11 et dans deux milieux de culture liquide, le milieu Middlebrook 7H9 et le milieu Sauton. Les composés principaux détectés pour les cultures de *Mycobacterium tuberculosis* sont présentés dans le tableau 2.

8 composés spécifiques de *Mycobacterium tuberculosis* ont été isolés à partir de bactéries cultivées sur le milieu solide, 6 ont été isolés pour les bactéries cultivées en milieu liquide 7H9 et 5 pour le milieu sauton. Le nicotinate de méthyle et le p-anisate de méthyle ont été détectés après croissance sur le milieu solide et dans un des deux milieux liquides. Cette donnée est en accord avec les résultats obtenus par Syhre et al. [14] et confirme la spécificité de ces deux composés comparativement au phénylacétate de méthyle et au 2-méthoxybiphényle (non présents dans le tableau). En plus du nicotinate de méthyle et du p-anisate de méthyle, 3 autres composés ont été détectés après culture avec deux milieux différents de croissance. Ces composés sont le 4-méthylanisole, le benzothiazole et le 2-aminobenzoate de méthyle. Cependant, ces quatre composés n'ont été détectés que pour 2 souches de *Mycobacterium tuberculosis* sur les 5 testées alors que le nicotinate de méthyle et le p-anisate de méthyle l'ont été pour 4 des 5 souches testées. Le nicotinate de méthyle et le p-anisate de méthyle apparaissent donc comme des marqueurs plus fiables que le 4-méthylanisole, le benzothiazole et le 2-aminobenzoate de méthyle.

Tableau 2. Composés volatils émis par des cultures de *Mycobacterium tuberculosis* dans différents milieux de croissance [19].

	Milieu de culture Middlebrook 7H11	Milieu de culture Middlebrook 7H9	Milieu de culture Sauton
4-hydroxy-4-méthylpentan-2-one	+		
4-méthylanisole	+	+	
4-méthyl-5-hexanolide	+		
Nicotinate de méthyle	+	+	
Benzothiazole	+	+	
2-aminobenzoate de méthyle	+	+	
p-anisate de méthyle	+		+
P-anisate d'éthyle	+		
Phénol		+	
Acétate de Benzyle		+	
Triméthoxyoxazole			+
Phénylacétaldéhyde			+
Benzoate de méthyle			+
Diméthylbenzoate de méthyle			+

Des études ont été menées par d'autres groupes en vue de corrélérer le profil de composés volatils émis par des cultures de bactéries et la composition de l'air expiré de malades de la tuberculose. Phillips et al. [16, 17] ont ainsi isolé 10 composés considérés comme spécifiques de l'infection par *Mycobacterium tuberculosis* dans l'haleine de patients malades. Ces 10 composés sont présentés dans le Tableau 3.

Tableau 3. Biomarqueurs volatils de l'infection par *Mycobacterium tuberculosis* [20, 21].

Culture de bactéries	Air expiré
1-méthylnaphtalène	3-(1-méthyléthyl)-oxétane
3-heptanone	4-méthylodécane
Méthylcyclododécane	Hexyl-cyclohexane
2,2,4,6,6-pentaméthylheptane	Bis-(3,5,5-triméthylhexyl)phtalate
1-méthyl-4-benzène	1,3,5-triméthylbenzène
(1-méthyléthyl)-cyclohexane	3,7-diméthylodécane
1,4-diméthyl-3,5-diméthylamphétamine	Tridécane
3-méthylbutanal	4,6,8-triméthyl-1-nonène
2-hexène	5-éthyl-2-méthylheptane
Trans-anti-1-méthyl-décahydronaphtalène	4-méthyl-1hexène

Une démarche similaire a été suivie par Kolk et al [22], qui proposent une liste de marqueurs collectés dans le Tableau 4.

Tableau 4. Composés marqueurs volatils détectés dans l'air expiré par des malades de la tuberculose et composés émis par des cultures de *Mycobacterium tuberculosis* ([22])

Culture de bactéries	Air expiré
2-propanamine	Dodécane
Isobutyronitrile	3-heptafluorobutyroxyptadécane
Isocyananoéthane	Acide-5-hexanoïque
Dodécane	2-éthyl-1-hexanol
Cyclohexanone	Acide tétradécanoïque
3-penten-2-one	Octanal
N, N-diméthylméthanethioamide	Composé inconnu
2-(diméthylamino)cyclohexanone	5-méthylpentadécane
N-méthyléthanamine	Nonane
Composé inconnu	1, 3 octanediol
	2-fluoroacétamide
	Composé inconnu
	3, 4-diphénylhexane

Les composés marqueurs isolés par ces deux derniers auteurs n'ont d'une part aucun point commun entre eux et d'autre part aucun élément commun avec les composés indiqués dans les études de Nawrath [15] et Syhre [14]. Les différences observées au niveau des composés volatils peuvent être expliquées en termes de différences au niveau des modes opératoires. Il convient alors de comparer les trois éléments principaux des modes opératoires mises en jeu : les sources des échantillons biologiques, la méthode de collecte des échantillons, le système analytique. Les sources des échantillons biologiques n'étant pas communes aux diverses études, une part non négligeable de la variabilité peut provenir de ce facteur. Mais il s'agit d'un facteur non contrôlable. Il paraît plus raisonnable de considérer les différences au niveau de la méthode d'échantillonnage et du système analytique.

Dans l'étude de Syhre [14], la collecte des composés volatils était effectuée au moyen de fibres MEPS (micro extraction en phase solide). Trois types de fibres ont été utilisés : une fibre PDMS (polydiméthylsiloxane), une fibre DVB/Carboxen/PDMS (divinylbenzène, carboxen, polydiméthylsiloxane) et Carbowax/DVB. Les différentes fibres ont été utilisées dans le but de couvrir une gamme de composés la plus large, des composés les moins polaires tels que les hydrocarbures aux plus polaires, tels que les acides carboxyliques ou les alcools. Les fibres étaient exposées aux composés volatils émis par les cultures pendant 20 h.

Nawrath et al. [15] ont collecté les composés volatils émis par des cultures sur du charbon actif. Les composés étaient ensuite désorbés en utilisant du dichlorométhane.

Phillips et al. [16, 17, 19] ont collecté les échantillons d'air expiré au moyen d'un système spécialement conçu dans leur laboratoire et nommé BCA (Breath collection apparatus). Il s'agit d'un

dispositif permettant de contrôler les paramètres de collecte des échantillons d'air expiré. Le système est décrit dans la figure suivante.

Le BCA fonctionne de la manière suivante : le sujet porte un masque couvrant son nez et sa bouche. La respiration se fait uniquement par la bouche. L'air expiré est recueilli dans un réservoir chauffé. Les composés volatils de l'air expiré sont piégés sur un adsorbant contenu dans un tube en acier inoxydable. Le volume d'air recueilli dans le réservoir est contrôlé par ordinateur, assurant une bonne reproductibilité du processus. Les adsorbants utilisés pour le piégeage des composés volatils sont des adsorbants de type carbopack et carbosieve. Ces adsorbants sont utilisés pour le piégeage de composés de poids moléculaire (C3-C20) et généralement de faible polarité (peu d'hétéroatomes types oxygène, azote).

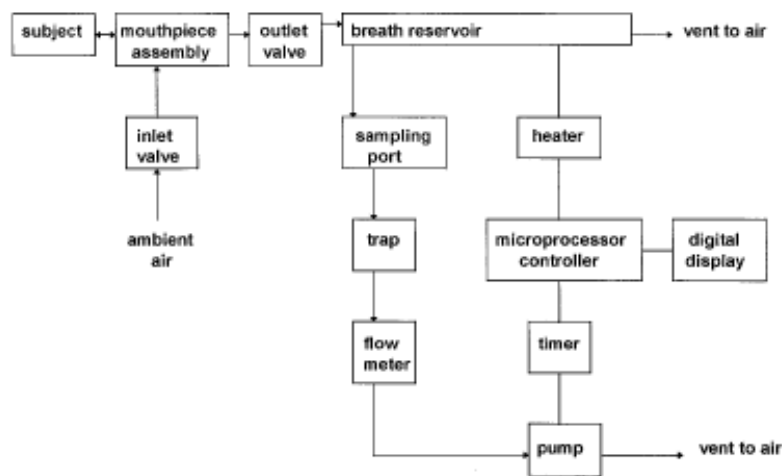


Figure 3. Schéma de fonctionnement du BCA [23].

La collecte des composés volatils émis par les bactéries cultivées et des échantillons d'air expiré a été effectuée par Kolk et al. [18] au moyen de tubes en acier inoxydable contenant comme adsorbants du carbograph 1 TD et du carbopack X. Ces adsorbants sont de même nature que les adsorbants utilisés par Phillips et al. [16, 17]. Les composés volatils étaient d'abord collectés dans des sacs en matière plastique Tedlar et ensuite transférés dans les tubes pour concentration et conservation.

Au premier abord, les méthodes d'échantillonnage des composés volatils sont différentes. Le principe repose sur la concentration des composés volatils sur un adsorbant puis sur la désorption des composés volatils. L'étude de Syhre et l'étude de Nawrath, dont les résultats présentaient le plus de similitudes, ont été menées en suivant une approche semblable. En effet, Syhre en utilisant trois types de fibres MEPS et Nawrath en utilisant du charbon actif, ont choisi de collecter une gamme très large de composés volatils. A l'opposé, Phillips et Kolk ont suivi une approche qui a restreint d'une certaine manière la gamme de composés volatils collectés. L'utilisation d'adsorbants de type charbon actif a restreint leur approche aux hydrocarbures et composés volatils possédant peu ou pas du tout de groupements polaires, ce qui justifie la composition des composés volatils trouvés dans ces deux études. Ces auteurs ont utilisé des colonnes chromatographiques de qualité similaire (généralement des colonnes en PDMS avec un greffage à 5% en groupement phényle, voir une deuxième colonne plus polaire pour un balayage optimal). Néanmoins ces résultats mettent en lumière le faible

recoupement des données entre les différentes études. Cette disparité de résultats pose le problème du choix des marqueurs à utiliser pour l'établissement d'une méthode de diagnostic fiable.

L'analyse des composés volatils contenus dans l'haleine des malades de la tuberculose s'avère être une démarche problématique en ce qui concerne la sélection des marqueurs adéquats. Le choix des marqueurs n'est cependant qu'une première étape, la mise au point d'un dispositif robuste permettant une détection sensible et spécifique à faible coût est un autre point crucial à aborder. La miniaturisation des appareillages apparaît être une étape logique vers ces objectifs.

III.3.3 Miniaturisation

L'analyse des composés volatils en tant que méthode de diagnostic est prometteuse mais reste pour l'instant réservée au laboratoire. La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse n'est pas une méthode de détection aisément transposable aux conditions de terrain : le matériel est coûteux et nécessite une dépense conséquente en énergie ; l'utilisation de la technique nécessite un personnel qualifié et l'équipement est lourd et non aisément transportable. Ces inconvénients limitent donc l'utilisation de la technique aux laboratoires des grandes villes des pays en voie de développement et la rendent inadaptée aux conditions de travail qui peuvent exister dans des dispensaires ou centres de soins périphériques.

Une solution pouvant permettre de réduire les coûts d'utilisation de telles méthodes et de les rendre plus adaptées à une utilisation mobile ou dans des zones dépourvues d'infrastructures est la miniaturisation. La conception d'un système miniature d'analyse des composés volatils requiert néanmoins de prendre en compte certaines considérations. Un système miniature doit être composé de trois unités distinctes remplissant des fonctions précises : la pré-concentration, l'analyse et la transduction du signal. La pré-concentration doit permettre de transférer un analyte présent en faible quantité dans un volume important vers un volume beaucoup plus réduit. L'étape d'analyse permet la reconnaissance et la quantification de l'analyte. La transduction permet la transcription du signal physique en valeurs interprétables.

Des travaux ont été effectués dans cette optique et ont été présentés. Phillips et al. ont développé un système composé d'un module tout-en-un destiné à l'analyse des composés volatils présents dans l'haleine de malades de la tuberculose [24]. Le système est composé du module de recueil de l'air expiré conçu dans leur laboratoire, d'un chromatographe en phase gazeuse miniature et d'un micro-ordinateur pour piloter l'ensemble et lire les résultats. Le diagnostic est effectué par reconnaissance d'un mélange de composés volatils tels que décrit dans des travaux précédents [21].

Un système portatif intégral de diagnostic de la tuberculose a été mis au point par Pariwono et al. [25]. Le système n'est pas basé sur la détection de composés marqueurs dans l'air expiré par les malades mais représente un progrès majeur. Ce système est basé sur la culture rapide de bactéries à partir d'échantillons de crachats et la détection de l'acide nicotinique émis par les bactéries au cours de leur développement. L'échantillon est traité et filtré et mélangé à un milieu de culture liquide pour favoriser le développement bactérien. L'acide nicotinique est détecté par spectrophotométrie d'absorption UV-visible par l'intermédiaire du produit coloré produit lors de la réaction de l'acide nicotinique avec le bromure de cyanogène et l'aniline (réaction de Koenig). La production d'acide nicotinique peut être observée après cinq jours d'incubation. Le résultat est directement lu sur le dispositif d'analyse. En comparaison des analyses par chromatographie en phase gazeuse dont le délai d'obtention du résultat peut être aussi court que 6 minutes, un délai de 5 jours paraît très long.

Cependant, le système de Pariwono et al. présente l'avantage d'avoir une taille très réduite puisqu'il tient dans la main et ne nécessite pas de qualification particulière pour son utilisation. Son coût d'utilisation est également réduit puisqu'il ne nécessite pas d'infrastructures importantes. Ces avantages le rendent particulièrement adapté à une utilisation dans les pays en voie de développement. Une marge de progression existe néanmoins notamment en termes d'échantillonnage et de délai. Un dispositif miniature basé sur la détection de composés marqueurs spécifiques éliminerait le besoin de traiter les échantillons biologiques, réduisant encore plus le risque d'incident et de contamination. L'élaboration de capteurs nanoporeux pour la détection de composés marqueurs de pathologies, en particulier de la tuberculose, est une étape supplémentaire vers l'élaboration de méthodes de diagnostic rapides, sensibles et de faible coût.

Le laboratoire Francis Perrin possède dans le domaine des capteurs nanoporeux de composés organiques volatils (COV) une grande expertise pour la détection des polluants de l'air intérieur. L'originalité de la méthode repose sur l'utilisation de matériaux nanoporeux innovants qui agissent comme des éponges pour concentrer les COV cibles, dont le *piégeage sélectif* est réalisé grâce à un choix éclairé des molécules sondes. Ces matériaux nanoporeux sont élaborés via le procédé Sol-Gel, une *méthode douce de synthèse, peu coûteuse et versatile*, qui permet, par un choix éclairé des précurseurs et des conditions de synthèse, l'obtention d'une grande variété de matériaux hydrophiles, hydrophobes, acides, basiques, hybrides organique-inorganiques avec des tailles de pores variables. Il est ainsi possible de réaliser des matériaux poreux dont la taille des pores et les propriétés physico-chimiques de la matrice poreuse sont contrôlées. Les avantages sont la possibilité de confiner et de stabiliser les molécules sondes et de fournir des conditions physico-chimiques locales favorables à la sélectivité et à la cinétique de la réaction-cible.

Cette versatilité est également présente dans la mise en forme des matériaux et permet l'obtention de films minces, de poudres nanométriques et de matrices monolithiques de formes variées, adaptées au mode de lecture choisi. Ces matériaux présentent aussi une surface spécifique d'adsorption particulièrement élevée, pouvant varier entre 450 et 1000 m².g⁻¹, ce qui les rend particulièrement attractifs pour les applications dans le domaine des capteurs chimiques.

Le laboratoire a déjà démontré l'efficacité de ces matériaux pour la détection du formaldéhyde dans l'air et de la trichloramine dans les piscines. Ces capteurs sont commercialisés. Plus récemment, le laboratoire a mis à profit son expertise pour la détection de métabolites bactériens pour la discrimination des pathogènes tels que *Escherichia Coli*, par la mesure soit de métabolite spécifique de la bactérie [26], soit par la détection d'un métabolite exogène issu de la coupure d'un substrat porteur du métabolite par une enzyme spécifique de la bactérie [27].

Il faut noter que les concentrations de COV les plus basses que le laboratoire ait détectées jusqu'à présent sont de l'ordre de la centaine de ppt, notamment pour le formaldéhyde dans l'air extérieur par une méthode de mesure fluorimétrique avec l'utilisation de capteurs nanoporeux. Détecter des teneurs sub-ppt de COV sera un grand défi.

IV. Les objectifs du projet

Le projet de thèse s'inscrit dans le cadre d'un projet collaboratif COVADIS avec plusieurs partenaires académiques et industriels. L'objectif principal du projet pour le laboratoire est la mise au point d'un capteur nanoporeux destiné à la détection de marqueurs spécifiques de la tuberculose

dans l'haleine des malades. Sur les recommandations de notre partenaire bioMérieux, l'étude sera focalisée sur la détection de l'acide nicotinique, qui s'avère être le marqueur le plus spécifique émis par *Mycobacterium tuberculosis*, le bacille de la tuberculose. Le cahier de charge est fortement contraignant, car il s'agira de pouvoir détecter des concentrations d'acide nicotinique dans l'haleine aussi faibles que quelques dizaines à quelques centaines de ppq (partie par quadrillion), ce qui correspondrait à des concentrations de quelques dizaines à la centaine de pM (picoM) en phase liquide dans un condensat d'haleine. Par ailleurs, le coût du consommable devra être inférieur à 10\$ pour être compétitif avec les autres méthodes. Cet objectif nécessite plusieurs études.

Dans un premier temps, il s'agira de rechercher et d'étudier une réaction permettant la détection spécifique de l'acide nicotinique en solution parmi les quatre autres marqueurs isolés par Syhre et al. [17], le nicotinate de méthyle, le p-anisate de méthyle, le phénylacétate de méthyle et le 2-méthoxy biphényle. Cette première étape a pour objectif de déterminer les conditions optimales de la réaction entre la molécule-sonde choisie et l'acide nicotinique avant de transposer la réaction en milieu solide. Les paramètres tels que le pH du milieu, la présence de tampon, les concentrations de réactifs seront étudiés et optimisés pour la détermination d'une limite de détection en milieu liquide. Nous testerons également la possibilité de doser l'acide nicotinique dans les mélanges complexes contenant les marqueurs pré-cités et dans les milieux biologiques tels que le condensat d'haleine, la salive et l'urine.

Notre objectif étant de détecter l'acide nicotinique dans l'air expiré par les malades, et l'haleine contenant de fortes quantités de vapeur d'eau et de dioxyde de carbone, nous devons produire dans une 2^{ème} étape diverses matrices nanoporeuses pour répondre à ces contraintes. Ces matrices nanoporeuses seront des matrices inorganiques ou hybrides organique-inorganiques synthétisées selon le procédé sol-gel. Pour ces matrices, il s'agira d'étudier plus particulièrement leurs propriétés hydrophyle/hydrophobe et de sonder le pH intrapore en fonction des fonctionnalités apportées à la matrice. A cet effet, nous dopons des matrices nanoporeuses d'un colorant sensible au pH, le bleu de bromothymol, qui seront exposées à des flux gazeux contenant de la vapeur d'eau et/ou du dioxyde de carbone. Le BBT étant un colorant sensible au pH, les études du déplacement de l'équilibre acido-basique dans les matrices nanoporeuses en fonction de l'apport d'eau et de gaz carbonique nous apporteront des informations précieuses sur les propriétés intrinsèques des matrices. Ces dernières sont particulièrement importantes car elles peuvent influencer sur le piégeage de l'acide nicotinique et sur sa réaction avec la molécule-sonde.

Dans la dernière étape, nous synthétiserons diverses matrices dopées de molécules-sonde, sous forme de blocs monolithiques et de films minces, pour le piégeage et la détection de l'acide nicotinique en phase gazeuse. A cet effet, un effort important devra porter sur la génération de mélanges gazeux calibrés d'acide nicotinique pour laquelle aucune méthode n'existe dans la littérature. Nous étudierons l'exposition de ces matrices en sondant plus particulièrement l'effet des divers interférents, dont l'eau ainsi que les autres métabolites marqueurs. Nous concluons sur le potentiel des capteurs nanoporeux pour la détection de l'acide nicotinique en phase gazeuse à de faibles teneurs.

Bibliographie

1. Prasad, A., et al., *Imaging features of pediatric musculoskeletal tuberculosis*. Pediatric Radiology, 2012. **42**(10): p. 1235-1249.
2. Ho, S., *Cutaneous tuberculosis : clinical features, diagnosis and management*. H.K. Dermatology and venereology Bulletin, 2003. **11**: p. 130-138.
3. Swaminathan, S. and B. Rekha, *Pediatric Tuberculosis: Global Overview and Challenges*. Clinical Infectious Diseases, 2010. **50**: p. S184-S194.
4. Armstrong, D., *Led-based fluorescence microscopy and the paralens system : illuminating the future of Tb diagnostics*. Tuberculosis, 2010(7): p. 17-18.
5. Kivihya-Ndugga, L.E.A., et al., *A comprehensive comparison of Ziehl-Neelsen and fluorescence microscopy for the diagnosis of tuberculosis in a resource-poor urban setting*. International Journal of Tuberculosis and Lung Disease, 2003. **7**(12): p. 1163-1171.
6. Drancourt, M., et al., *Blood agar and Mycobacterium tuberculosis: the end of a dogma*. Journal of Clinical Microbiology, 2003. **41**(4): p. 1710-1711.
7. Chihota, V.N., et al., *Liquid vs. solid culture for tuberculosis: performance and cost in a resource-constrained setting*. International Journal of Tuberculosis and Lung Disease, 2010. **14**(8): p. 1024-1031.
8. Boehme, C.C., et al., *Rapid Molecular Detection of Tuberculosis and Rifampin Resistance*. New England Journal of Medicine, 2010. **363**(11): p. 1005-1015.
9. Whitelaw, A., et al., *Comparative cost and performance of light-emitting diode microscopy in HIV-tuberculosis-co-infected patients*. European Respiratory Journal, 2011. **38**(6): p. 1393-1397.
10. Phillips, M., et al., *Volatile organic compounds in breath as markers of lung cancer: a cross-sectional study*. Lancet, 1999. **353**(9168): p. 1930-1933.
11. Tisch, U., et al., *Detection of Alzheimer's and Parkinson's disease from exhaled breath using nanomaterial-based sensors*. Nanomedicine, 2013. **8**(1): p. 43-56.
12. Qiao, Y., et al., *Breath Ketone Testing: A New Biomarker for Diagnosis and Therapeutic Monitoring of Diabetic Ketosis*. Biomed Research International, 2014.
13. Mgode, G.F., et al., *Diagnosis of Tuberculosis by Trained African Giant Pouched Rats and Confounding Impact of Pathogens and Microflora of the Respiratory Tract*. Journal of Clinical Microbiology, 2012. **50**(2): p. 274-280.
14. Mgode, G.F., et al., *Ability of Cricetomys rats to detect Mycobacterium tuberculosis and discriminate it from other microorganisms*. Tuberculosis, 2012. **92**(2): p. 182-186.
15. Suckling, D.M. and R.L. Sagar, *Honeybees Apis mellifera can detect the scent of Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculosis, 2011. **91**(4): p. 327-328.
16. Phillips, M., et al., *Variation in volatile organic compounds in the breath of normal humans*. Journal of Chromatography B, 1999. **729**(1-2): p. 75-88.
17. Syhre, M. and S.T. Chambers, *The scent of Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculosis, 2008. **88**(4): p. 317-323.
18. Syhre, M., et al., *The scent of Mycobacterium tuberculosis - Part II breath*. Tuberculosis, 2009. **89**(4): p. 263-266.
19. Nawrath, T., et al., *The volatiles of pathogenic and nonpathogenic mycobacteria and related bacteria*. Beilstein Journal of Organic Chemistry, 2012. **8**: p. 290-299.
20. Phillips, M., et al., *Volatile biomarkers of pulmonary tuberculosis in the breath*. Tuberculosis, 2007. **87**(1): p. 44-52.
21. Phillips, M., et al., *Breath biomarkers of active pulmonary tuberculosis*. Tuberculosis, 2010. **90**(2): p. 145-151.
22. Kolk, A.H.J., et al., *Breath analysis as a potential diagnostic tool for tuberculosis*. International Journal of Tuberculosis and Lung Disease, 2012. **16**(6): p. 777-782.

23. Phillips, M., *Method for the collection and assay of volatile organic compounds in breath*. Analytical Biochemistry, 1997. **247**(2): p. 272-278.
24. Phillips, M., et al., *Point-of-care breath test for biomarkers of active pulmonary tuberculosis*. Tuberculosis, 2012. **92**(4): p. 314-320.
25. Pariwono, A.M., et al., *Rapid palm sized-all in one tuberculosis screening system*. 2006 International Conference on Biomedical and Pharmaceutical Engineering, Vols 1 and 22006, New York: Ieee. 372-376.
26. Crunaire, S., et al., *Discriminating Bacteria with Optical Sensors Based on Functionalized Nanoporous Xerogels*. Chemosensors, 2014. **2**(2): p. 171-181.
27. Guillemot, L.H., et al., *Facile and fast detection of bacteria via the detection of exogenous volatile metabolites released by enzymatic hydrolysis*. Physical Chemistry Chemical Physics, 2013. **15**(38): p. 15840-15844.

CHAPITRE I

Propriétés des composés marqueurs de la tuberculose

I. Introduction

L'ensemble des groupes de recherche sur les marqueurs gazeux de la tuberculose pulmonaire fondent leur approche sur une analyse chimique exhaustive de l'air exhalé par les patients, suivie de la détermination par des méthodes statistiques d'une signature discriminante. Les méthodes analytiques principales sont basées sur la spectrométrie de masse (GC-MS, PTR-MS, SIFT-MS) ou les nez artificiels. Les méthodes d'analyse discriminantes classiquement utilisées en analyse chimométrique comme l'analyse à composantes principales (PCA : Principal Component Analysis), l'analyse discriminante linéaire (LDA : Linear Discriminant Analysis), la logique floue, ou encore les réseaux de neurones, ... ne sont pas adaptées à la mise au point d'un test de dépistage non-invasif de la tuberculose pulmonaire active. En effet, de telles méthodes supposent l'utilisation d'un pool de patients représentatif de la variabilité naturelle de la population en termes de composition d'haleine, ce qui n'est jamais le cas dans les études publiées. Une autre difficulté est qu'il n'existe quasiment aucun recoupement entre les signatures obtenues par différents groupes, voire par un même groupe dans plusieurs publications successives (exemple du groupe de M. Phillips en 2007 et 2010, avec pourtant la même méthode analytique).

Ces considérations nous confortent dans l'idée qu'il faudra rechercher les marqueurs les plus spécifiques et les méthodes d'analyse les plus sélectives. Nous nous sommes appuyés dans ce travail sur les résultats des chercheurs de l'Université d'Otago [1] avec lesquels travaillent les chercheurs de bioMérieux. Ces chercheurs ont établi une liste de cinq marqueurs très spécifiques de la TB dont le principal est l'acide nicotinique, mais aussi le nicotinate de méthyle, le p-anisate de méthyle, le phénylacétate de méthyle, et l'o-phénylanisole. Tous ces composés sont présents en de très faibles quantités, probablement du fait du métabolisme extrêmement lent de *M.tuberculosis*, et de leur dilution due à la ventilation pulmonaire (~12 litres/min). En 2013, les chercheurs de l'Université d'Otago révèlent après des études complémentaires sur d'autres cohortes de patients que trois des marqueurs identifiés comme fiables, le nicotinate de méthyle, le phénylacétate de méthyle et l'o-phénylanisole peuvent en fait induire des faux positifs [2]. Le nicotinate de méthyle en particulier est trouvé de façon récurrente chez les fumeurs. Ces composés pouvant être des interférents potentiels de l'acide nicotinique, nous avons étudié leur effet sur la détection de l'acide nicotinique. Avant de détecter l'acide nicotinique et ses interférents, nous présentons dans ce chapitre les caractéristiques physico-chimiques et toxicologiques de ces marqueurs.

II. Propriétés des composés marqueurs de la tuberculose

II.1 L'acide nicotinique (AN)

L'acide nicotinique (acide 3-pyridine carboxylique selon l'IUPAC, CAS : 59-67-6) est aussi appelé Niacine. Il est l'un des deux composants de la vitamine B3 ou PP, une vitamine importante pour la santé humaine. Leur structure est présentée dans la Figure 4.

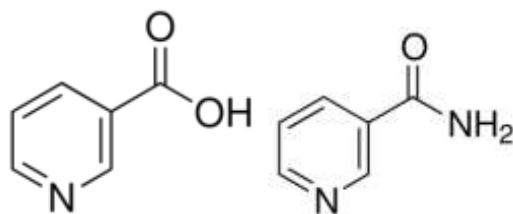


Figure 4. Structure chimique de l'acide nicotinique (gauche) [3] et du nicotinamide (droite) [4], les deux composants de la vitamine B3.

L'acide nicotinique peut être retrouvé dans de nombreux aliments comme le montre le Tableau 5.

Tableau 5. Aliments contenant de la niacine. [5]

Aliments riches en vitamine B3	Quantité de vitamine B3
Levure de bière (100g)	38 mg
Levure de boulanger (100g)	37 mg
Foie de veau (100g)	17 mg
Lapin (100g)	12,8 mg
Thon en boîte (100g)	10,8 mg
Rognons de porc (100g)	9,8 mg
Maquereau (100g)	7,7 mg
Saumon, flétan (100g)	7 mg
Poulet (100g)	6,8 mg
Veau (100g)	6,3 mg
Champignons (100g)	6,2 mg
Poire (1)	3,8 mg
Fruits secs (100g)	2 à 5 mg
Pain complet (100g)	3 mg
Petit pois frais (100g)	2,5 mg
Haricots secs (100g)	2,5 mg
Lentilles (100g)	2 mg
Riz (100g)	1,6 mg
Pomme (1)	1,3 mg
Pommes de terre (100g)	1,2 mg
Artichaut (100g)	1 mg
Epinard (100g)	0,6 mg
Lait (200ml)	0,15 mg
Oeufs entiers (2)	0,1 mg

En cas d'apports alimentaires insuffisants, l'organisme peut synthétiser l'acide nicotinique à partir d'un acide aminé, le tryptophane. Une carence en acide nicotinique peut entraîner la pellagre, maladie caractérisée par des diarrhées, des problèmes cutanée (dermatites), des crises de démence et éventuellement la mort dans les cas les plus extrêmes. C'est pour cette raison que la vitamine B3 est également appelée vitamine PP pour Pellagra Preventive.

Bien que réunis sous la dénomination commune de niacine, l'acide nicotinique et le nicotinamide n'ont pas les mêmes propriétés. L'acide nicotinique peut être utilisé comme traitement visant à augmenter le "bon" cholestérol (HDL) et a également un effet vasodilatateur. Son dérivé amidique, le nicotinamide, ne possède pas ces propriétés. Tous deux sont des précurseurs du NAD⁺ (Nicotinamide Adenine Dinucleotide) et du NADP⁺ (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate). Ces deux composés sont des cofacteurs² indispensables à la mise en œuvre de processus métaboliques de fourniture d'énergie comme la glycolyse et la phosphorylation oxydative.

² Cofacteur : composé chimique indispensable aux réactions de catalyse enzymatique. Les cofacteurs sont liés aux enzymes et permettent d'accroître leur activité catalytique.

Les bactéries peuvent synthétiser de l'acide nicotinique, qui sert dans différents processus métaboliques. Il a été montré que l'acide nicotinique favorise la croissance de bactéries comme *Escherichia coli* en leur facilitant l'utilisation de glucose comme source d'énergie. Des études ont montré que *Mycobacterium tuberculosis* émet des quantités plus importantes d'acide nicotinique dans son milieu de croissance que des bactéries de la même famille. Ceci est dû au fait que *Mycobacterium tuberculosis* est dépourvu d'une enzyme transformant l'acide nicotinique NA en ribonucléotide, fragment primordial de l'ARN. L'acide nicotinique est accumulé dans la bactérie, qui le libère dans son milieu de croissance où il peut être détecté.

II.1.1 Propriétés toxicologiques

L'acide nicotinique ne présente pas de toxicité aiguë. Il peut comporter des effets nocifs pour des doses élevées et dépendant du mode d'absorption : la DL50 orale estimée chez le rat est de 7 g/kg et la DL50 sous cutanée est de 5 g/kg [6]. Les désagréments provoqués comprennent principalement des irritations de la peau et des voies respiratoires. Le composé peut gravement irriter les yeux en cas de contact.

II.1.2 Propriétés physico-chimiques à l'état fondamental et à l'état excité

L'acide nicotinique se présente sous la forme d'une poudre blanche inodore. Sa masse molaire est de 123,11 g.mol⁻¹ et sa masse volumique est de 1,463 g.mL⁻¹. Le composé est soluble dans l'eau à raison de 15 g.L⁻¹ à 25°C et dans l'éthanol à raison de 12,5 g.L⁻¹ [7]. L'acide nicotinique est un composé très peu volatil à l'état solide : sa température de fusion est comprise entre 236 et 239°C et sa pression de vapeur saturante à 25°C est de 5,7.10⁻⁶ mm de mercure [8]. La valeur de la constante de Henry à 25°C est estimée à 1,93.10⁵ mol.m⁻³.Pa⁻¹ [8, 9]^{3,4}, le composé étant très peu volatil.

L'acide nicotinique peut exister sous trois formes différentes, suivant l'acidité du milieu. Le passage d'une forme à l'autre du composé est régi par l'existence de deux constantes d'acidité. Selon Rollet et al., la valeur des pKa de l'acide nicotinique est pKa₁ = 2,09 et pKa₂ = 4,85 [10]. Ces valeurs concordent avec les données de Appleby et al., pKa₁ = 2,17 et pKa₂ = 4,8 [11]. La Figure 5 présente les trois formes de l'acide nicotinique.

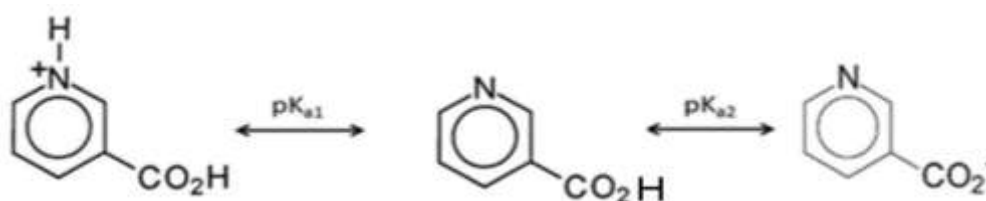


Figure 5. Les trois formes de l'acide nicotinique en solution en fonction du pH.

Les spectres d'absorption de l'acide nicotinique à différents pH sont montrés dans la Figure 6.

³ La constante de Henry est décrite par l'expression $k_H = C_i/P_i$ avec C_i = la concentration en solution aqueuse en mol.m⁻³ et P_i = la pression partielle dans la phase gazeuse en Pascal (Pa). Les valeurs trouvées dans la littérature sont exprimées en atm.m³.mol⁻¹, ce qui correspond à 1/k_H avec la pression en atmosphère. Nous avons recalculé k_H à partir des valeurs de la littérature en utilisant le pascal comme unité de pression.

⁴ Valeur de la littérature pour AN : 5,11 10⁻¹¹ atm.m³.mol⁻¹. (1 atm : 1,013 10⁵ Pa)

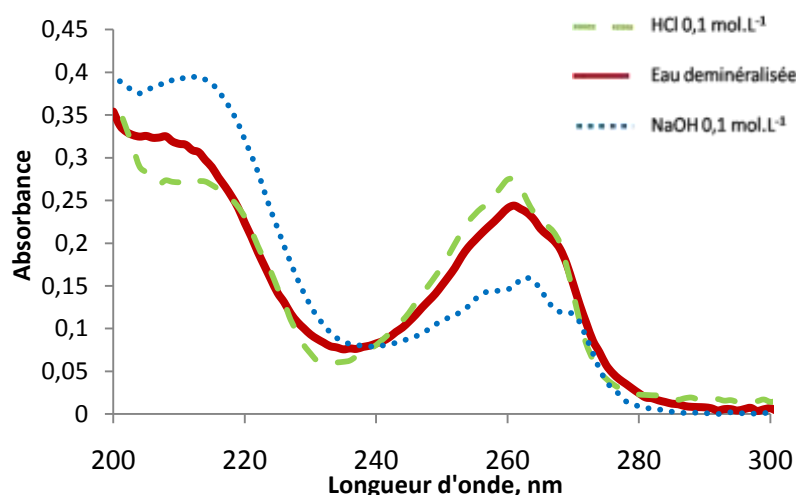


Figure 6. Spectre d'absorption de l'acide nicotinique dans une solution d'acide chlorhydrique 0,1 mol.L⁻¹, une solution d'hydroxyde de sodium 0,1 mol.L⁻¹ et dans l'eau. AN : 50 μmol.L⁻¹.

Le spectre de l'acide nicotinique en solution aqueuse présente deux transitions électroniques de type $\pi \rightarrow \pi^*$ dans le domaine ultraviolet. La première bande, sous forme d'un épaulement, est située entre 200 et 220 nm et la seconde bande 230 et 270 nm. La seconde bande d'absorption présentant des structures vibrationnelles est centrée à 261 nm en solution d'acide chlorhydrique et subit un décalage vers le rouge ainsi qu'un effet hypochrome à mesure que le pH du milieu augmente. La longueur d'onde au maximum est de 263 nm dans l'eau et en solution d'hydroxyde de sodium.

Les valeurs des coefficients d'extinction molaire au maximum d'absorption des bandes sont rassemblées dans le Tableau 6.

Tableau 6 : Propriétés optiques de l'acide nicotinique dans différents milieux aqueux

Milieu	λ_{\max} (nm)	ϵ (M ⁻¹ .cm ⁻¹)
HCl 0,1 mol.L ⁻¹	215	5030 ± 250
	261	5360 ± 270
Eau	208	6520 ± 330
	263	4520 ± 230
NaOH 0,1 mol.L ⁻¹	213	7900 ± 400
	263	3160 ± 300

Le premier état singulet excité de l'acide nicotinique n'est pas fluorescent et se désactive en partie par conversion intersystème vers l'état triplet. L'énergie de l'état excité triplet le plus bas a été déterminée. Yan et al l'ont estimé à 21739 cm⁻¹ [12], alors que Chen et al. ont déterminé une valeur de 23923 cm⁻¹ [13] et Latva et al. indiquent une valeur de 24721 cm⁻¹ [14].

II.2 Le nicotinate de méthyle (NM)

Le nicotinate de méthyle (3-pyridine carboxylate de méthyle, cas : 93-60-7) est l'ester méthylique de l'acide nicotinique. Le nicotinate de méthyle peut être trouvé dans des plantes, notamment des fruits comme les fraises et la papaye, pour lesquels il intervient dans l'arôme. Pour cette raison, le nicotinate de méthyle peut servir comme agent de saveur pour des produits comme les cigarettes.

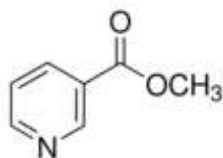


Figure 7. Structure chimique du nicotinate de méthyle. [15]

Dans le domaine des cosmétiques, le nicotinate de méthyle peut avoir comme actions de soulager les inflammations de la peau et du cuir chevelu et de réparer les dommages de la peau, notamment en cas de problèmes de sécheresse cutanée. Il peut également être utilisé dans les rouges à lèvres, dans lesquels son action vasodilatatrice locale amplifie la coloration rouge des lèvres et augmente légèrement leur volume. Ce composé est utilisé dans des préparations pharmaceutiques en raison de ses propriétés anti douleurs et vasodilatatrices. Dans le domaine de la santé, il est principalement utilisé pour soulager les douleurs et inflammations musculaires, tendineuses et articulaires. Pour la grande majorité de ces effets, le nicotinate de méthyle est utilisé en tant que précurseur de l'acide nicotinique. Sa fonction méthyle le rend plus liposoluble que l'acide nicotinique et favorise sa pénétration dans les milieux lipophiles du corps comme la peau. Une fois passée la barrière cutanée, le composé est hydrolysé par l'enzyme carboxylestérase, pour fournir du méthanol et l'acide nicotinique [16].

II.2.1 Propriétés toxicologiques

Le nicotinate de méthyle est un composé non toxique. La dose létale par voie parentérale (par injection) pour ce composé est estimée à plus de 2 g/kg chez la souris [17]. Il possède néanmoins un léger effet irritant en contact avec les yeux et les muqueuses respiratoires.

II.2.2 Propriétés physico-chimiques

Le nicotinate de méthyle se présente sous la forme d'une poudre blanche cristalline. Sa masse moléculaire est de 137,14 g.mol⁻¹. Son point de fusion est compris entre 40 et 42°C [16] et son point d'ébullition est de 204°C [18]. Le nicotinate de méthyle est soluble dans l'eau à raison de 47 g.L⁻¹ [18]. Sa tension de vapeur est 0,277 mm Hg et sa constante de Henry est de 215 mol.m⁻³.Pa⁻¹ à 20°C [19]⁵. Le composé est environ 49000 fois plus volatil que l'acide nicotinique à l'état pur et 900 plus volatil que l'acide nicotinique en solution aqueuse.

La présence d'un azote pyridinique apporte un caractère acido-basique au nicotinate de méthyle. Perrin et al. ont déterminé une valeur de pK_a de 3,13 [20], concordante avec celle de Zhou et al., qui ont déterminé une valeur de pK_a de 3,2 [21].

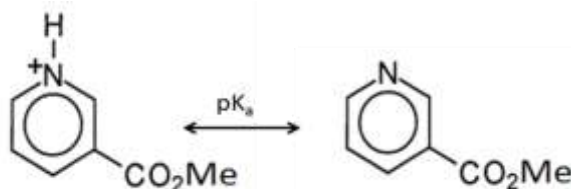


Figure 8. Les deux formes du nicotinate de méthyle.

Les spectres d'absorption du nicotinate de méthyle dans divers milieux aqueux sont montrés dans la Figure 9.

⁵ Valeur de la littérature pour NM : 4,58 10⁻⁸ atm.m³.mol⁻¹

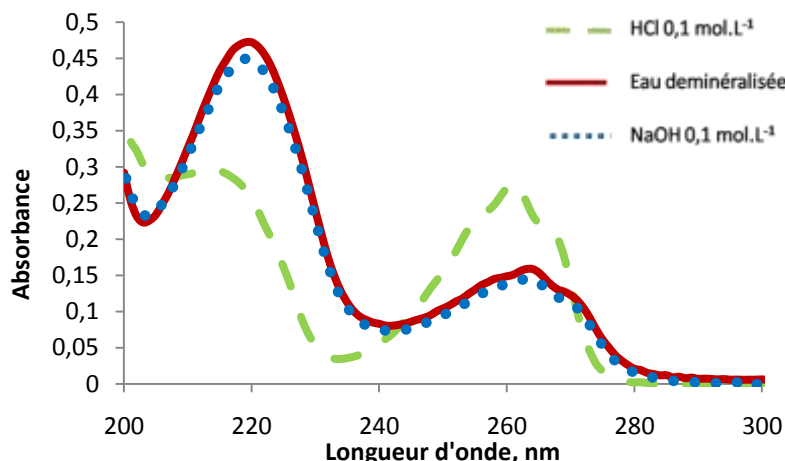


Figure 9. Spectres d'absorption du nicotinate de méthyle dans une solution d'acide chlorhydrique $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, une solution d'hydroxyde de sodium $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ et dans l'eau. NM : $50 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$.

Le spectre d'absorption du nicotinate de méthyle présente deux transitions électroniques dans l'ultraviolet. La position des maxima d'absorption et les valeurs des coefficients d'extinction molaire correspondantes sont collectées dans le Tableau 7.

Tableau 7. Propriétés optiques du nicotinate de méthyle dans différents milieux aqueux

Milieu aqueux	$\lambda(\text{nm})$	$\varepsilon (\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1})$
Eau	220	9440 ± 470
	264	3200 ± 200
NaOH $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$	219	8990 ± 450
	263	2700 ± 200
HCl $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$	214	5900 ± 300
	261	5500 ± 300

Comme l'acide nicotinique, le nicotinate de méthyle à l'état excité n'est pas luminescent. Les propriétés optiques de l'état triplet n'ont en revanche pas fait l'objet d'étude dans la littérature, à notre connaissance.

II.3 Le para-anisate de méthyle (pAM)

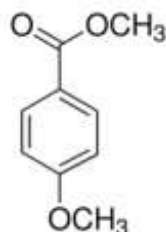


Figure 10. Structure chimique du p-anisate de méthyle. [22]

Le p-anisate de méthyle (4-méthoxy benzoate de méthyle, cas : 121-98-2) est l'ester méthylique de l'acide p-anisique (nom IUPAC : acide 4-méthoxybenzoïque). Le p-anisate de méthyle est utilisé dans l'industrie cosmétique en tant qu'agent masquant pour éliminer l'odeur désagréable d'autres constituants.

II.3.1 Propriétés toxicologiques

Le p-anisate de méthyle n'est pas toxique. La DL50 estimée pour le rat par voie orale est supérieure à 5 g/kg. La DL50 par application cutanée estimée sur le lapin est également supérieure à 5 g/kg. Un contact prolongé pendant plus de 24 h n'a entraîné qu'une légère irritation de la peau à l'endroit de l'application [23].

II.3.2 Propriétés physico-chimiques

Le p-anisate de méthyle est une poudre blanche. Il possède une masse molaire de 166,17 g.mol⁻¹. Son point de fusion est 49°C et son point d'ébullition se situe entre 244 et 245°C [18]. Le composé est soluble dans l'eau à raison de 0,643 g.L⁻¹ [18]. La tension de vapeur du para anisate de méthyle est de 0,0118 mm Hg à 25°C [19] et sa constante de Henry de 482 mol.m⁻³.Pa⁻¹ [24]⁶. Le composé est 2800 fois plus volatil à l'état solide et 40000 fois plus volatil que l'acide nicotinique en solution aqueuse.

Le spectre d'absorption du p-anisate de méthyle dans l'eau est présenté dans la Figure 11. Le spectre d'absorption du p-anisate de méthyle présente deux transitions électroniques dans l'ultraviolet. La première transition est visible sous la forme d'un épaulement centré autour de 208 nm. La seconde transition est une bande d'absorption centrée à 257 nm. Les valeurs de coefficient d'extinction molaire sont respectivement de 12660 ± 630 M⁻¹.cm⁻¹, 14600 ± 730 M⁻¹.cm⁻¹ et de 14100 ± 700 M⁻¹.cm⁻¹ à 208 nm, 257 et 260 nm.

Le p-anisate de méthyle n'est pas luminescent en solution. Les propriétés de l'état triplet excité n'ont pas fait l'objet d'étude dans la littérature, à notre connaissance.

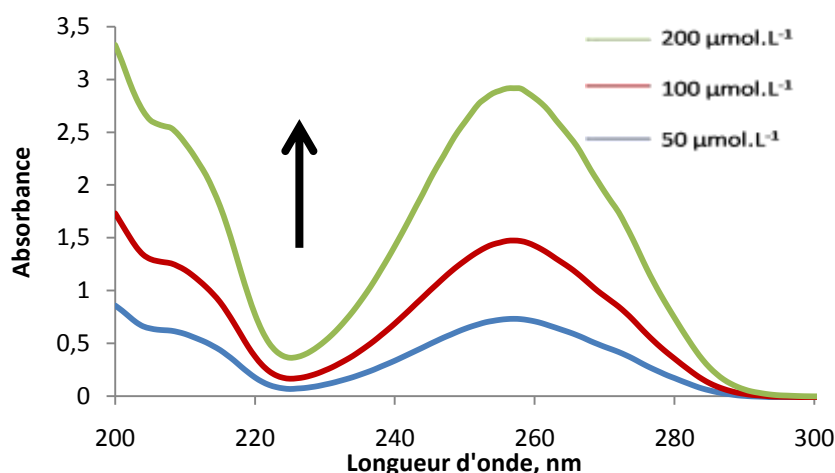


Figure 11. Spectre d'absorption UV-visible du para-anisate de méthyle dans l'eau.

II.4 Le phénylacétate de méthyle (PM)

Le phénylacétate de méthyle (benzène acétate de méthyle, CAS : 101-47-7) est l'ester méthylique de l'acide phénylacétique (acide benzène acétique, CAS : 103-82-2). Ce composé est naturellement présent dans le miel. De par sa forte odeur, il sert en parfumerie pour apporter un arôme de miel à la fragrance. Il est utilisé dilué justement en raison de son odeur intense.

⁶ Valeur de la littérature pour pAM : 2,05 10⁻⁶ atm.m³.mol⁻¹.

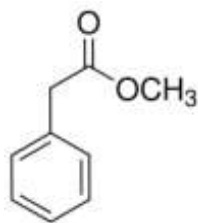


Figure 12. Structure chimique du phénylacétate de méthyle. [25]

II.4.1 Propriétés toxicologiques

Le phénylacétate de méthyle n'est pas toxique. La DL50 orale estimée pour le rat est de 2,55 g/kg et la DL50 dermale estimée pour le lapin est de 2,4 g/kg. Une application de 24 h sur le lapin ne provoque qu'une légère irritation de la peau au point d'application. Le composé est également irritant pour les yeux [26].

II.4.2 Propriétés physico-chimiques

Le phénylacétate de méthyle se présente sous la forme d'un liquide transparent. Son poids moléculaire est de 150,17 g.mol⁻¹ et sa masse volumique est de 1,04 g.mL⁻¹ [27]. Son point d'ébullition est de 218°C et sa solubilité dans l'eau est de 2,07 g.L⁻¹ [28]. La tension de vapeur du composé est de 0,164 mm Hg [19] et sa constante de Henry de 0,695 mol.m⁻³.Pa⁻¹ [24]⁷. Le composé est 29000 fois plus volatil que l'acide nicotinique à l'état pur et 280000 fois plus volatil en solution aqueuse.

Le phénylacétate de méthyle est peu soluble dans l'eau. Son spectre d'absorption dans l'éthanol est montré dans la Figure 13.

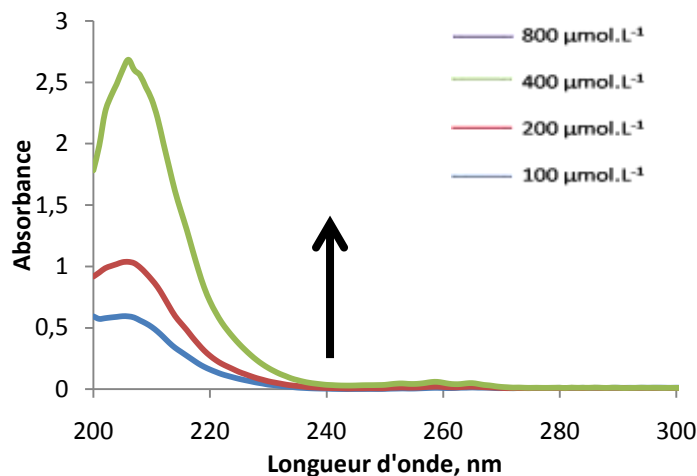


Figure 13. Spectre d'absorption UV-visible du phénylacétate dans l'éthanol

Il présente une 1^{ère} bande large intense avec un maximum centré à 206 nm et une 2^{ème} beaucoup moins intense centrée à 259 nm avec deux bandes vibrationnelles à 253 et 265 nm. Les valeurs des coefficients d'extinction molaire à 206 nm, 259 et 260 sont respectivement de 6600 ± 235 M⁻¹.cm⁻¹, 152 ± 10 M⁻¹.cm⁻¹ à 259 nm et de 130 ± 10 M⁻¹.cm⁻¹ à 260 nm.

⁷ Valeur de la littérature pour PM : 1,42 10⁻⁵ atm.m³.mol⁻¹.

Le phénylacétate de méthyle n'est pas luminescent en solution et les propriétés optiques de l'état triplet excité correspondant n'ont pas fait l'objet d'étude dans la littérature, à notre connaissance.

II.5 Le 2-méthoxybiphényle (MB)

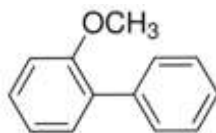


Figure 14. Structure chimique de l'o-phénylanisole. [29]

Le 2-méthoxybiphényl (nom IUPAC, autrement appelé ortho-phénylanisole, cas : 86-26-0) est un dérivé bicyclique du méthoxybenzène. Le méthoxybenzène est un éther méthylique du benzène. C'est un liquide incolore ayant une odeur proche de l'anis. L'anisole sert de précurseur à la synthèse d'autres molécules organiques utilisées dans l'industrie cosmétique et dans la fabrication de parfums.

II.5.1 Propriétés toxicologiques

La toxicité orale du 2-méthoxybiphényl a été évaluée par des tests sur les rats. La DL50 a été évaluée à 3,6 g/kg. La toxicité dermale du composé a été évaluée par des tests sur des lapins. La valeur a été estimée à 5 g/kg [30]. Le 2-méthoxybiphényl n'est pas toxique, mais peut provoquer des irritations de la peau, des yeux, du système respiratoire et du système digestif [31].

II.5.2 Propriétés physico-chimiques

L'o-phénylanisole se présente sous la forme d'un liquide transparent, de couleur légèrement jaune, à l'odeur prononcée. Sa masse molaire est de 184,23 g.mol⁻¹ et sa masse volumique est de 1,023 g.mL⁻¹. Le composé est insoluble dans l'eau et très soluble dans l'éthanol et le méthanol [31]. Son point de fusion est compris entre 30 et 33°C. Avec une tension de vapeur est de 0,007 mm Hg et une constante de Henry de 0,476 mol.m⁻³.Pa⁻¹ [19]⁸ l'o-phénylanisole est environ 1580 fois plus volatil que l'acide nicotinique à l'état pur. Le spectre d'absorption UV-visible du 2-méthoxybiphényl dans l'eau est présenté dans la Figure 15.

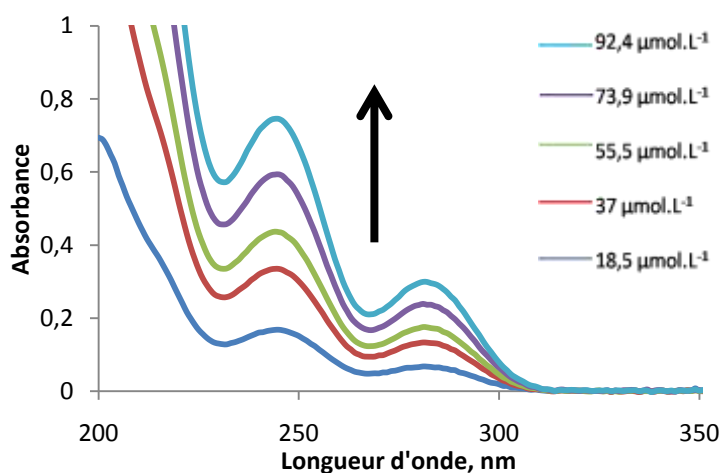


Figure 15. Spectre d'absorption du 2-méthoxybiphényl dans l'eau (après une première dilution dans le méthanol).

⁸ Valeur de la littérature pour MB : 2,45 10⁻⁵ atm.m³.mol⁻¹.

Le 2-méthoxybiphényle présente trois transitions électroniques dans l'ultraviolet : un front de montée à 200 nm suivi de deux transitions de plus faible énergie. Ces dernières correspondent à des bandes d'absorption centrées respectivement à 245 nm et à 281 nm. Les valeurs des coefficients d'extinction molaire à 245, 281 et 260 nm sont respectivement de $8100 \pm 400 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$, $3260 \pm 160 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ et de $3610 \pm 180 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$.

L'état excité singulet du 2-méthoxybiphényle n'est pas luminescent en solution et les propriétés optiques de l'état excité triplet n'ont pas fait l'objet de travail dans la littérature, à notre connaissance.

Le Tableau 8 résume et compare les propriétés les plus importantes des marqueurs que nous venons de décrire telles que la tension de vapeur, la constante de Henry et les propriétés optiques. Ces paramètres sont importants à connaître pour comparer leur réactivité en solution et à l'interface gaz-solide, comme nous le verrons dans les chapitres suivants.

Tableau 8 : Récapitulatif des propriétés importantes des marqueurs.

	AN	NM	pAM	PM	MB
Psat, mmHg	$5,7 \cdot 10^{-6}$	0,277	0,0118	0,164	0,007
Cste de Henry, $\text{mol}.\text{m}^{-3}.\text{Pa}^{-1}$	$1,93 \cdot 10^5$	215	4,82	0,695	0,476
λ_{max} , nm	pH 1 : 215, 261 pH 5 : 209, 263 pH 8 : 214, 263	pH 1 : 214, 261 pH 5 : 220, 264 pH 8 : 219, 263	208 257	206 259	245 281
ϵ_{max} , $\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$	pH 1 : 5030, 5360 pH 5 : 6520, 4520 pH 9 : 7900, 3160	pH 1 : 5900, 5500 pH 5 : 9440, 3200 pH 8 : 8990, 2700	12660 14600	6600 130	8100 3200

Les informations recueillies montrent que l'acide nicotinique est le composé le moins volatil parmi tous les marqueurs, qu'il soit pur ou en solution aqueuse. La détection et la discrimination de l'acide nicotinique ne sera pas aisée.

En raison de son faible coefficient d'extinction molaire et de son absence de luminescence intrinsèque dans les conditions normales, une détection optique directe n'est pas envisageable. C'est pourquoi il a été nécessaire d'utiliser une réaction chimique mettant en jeu une molécule-sonde apte à réagir avec l'acide nicotinique pour aboutir à la formation d'une espèce luminescente. Il s'agit d'une réaction de complexation avec des métaux de la famille des lanthanides et de l'exploitation de « l'effet antenne », qui va être présenté dans le chapitre suivant. Une propriété importante des composés à connaître pour pouvoir prédire la capacité d'un ligand à complexer un lanthanide et stimuler l'effet antenne est l'énergie de l'état triplet du composé. L'absence de données sur l'état triplet du nicotinate de méthyle, du p-anisate de méthyle, du phénylacétate de méthyle et du 2-méthoxy biphényle peut signifier soit que ces composés n'ont pas été étudiés dans cette optique ou que ces composés ne sont pas de bons ligands pour la complexation avec des lanthanides. Ce point sera abordé dans le chapitre suivant.

Bibliographie

1. Syhre, M. and S.T. Chambers, *The scent of Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculosis, 2008. **88**(4): p. 317-323.
2. Scott-Thomas, A., et al., *Assessment of potential causes of falsely positive Mycobacterium tuberculosis breath test*. Tuberculosis, 2013. **93**(3): p. 312-317.
3. Aldrich, S., *Fiche produit de l'acide nicotinique*. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/n4126?lang=fr®ion=FR>.
4. Aldrich, S., *Fiche produit du nicotinamide*. 2014. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/supelco/47865u?lang=fr®ion=FR>.
5. vitamines.org, G.d., *Les aliments riches en vitamines B3*. 2014. <http://www.guide-vitamines.org/vitamines/vitamine-b3/aliments-riches-vitamine-b3.html>.
6. *Toxicological informations on nicotinic acid*. Drugs in Japan, 1982. **6**.
7. Aldrich, S., *FDS Acide nicotinique*. 2012: p. 7.
8. Jubilant, *Jubilant life science Niacin Safety Data Sheet*, 2012.
9. Apollo, *Apollo scientific : Nicotinic acid safety data sheet*. 2012.
10. Rollet, F., C. Richard, and J.P. Aguer, *Laser flash photolysis study of nicotinic acid in water*. Journal of Photochemistry and Photobiology a-Chemistry, 2002. **153**(1-3): p. 33-40.
11. Appleby, C.A., Wittenbe.Ba, and Wittenbe.Jb, *Nicotinic acid as a ligand affecting leghemoglobin structure and oxygen reactivity*. . Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1973. **70**(2): p. 564-568.
12. Yan, B., H.J. Zhang, and J.Z. Ni, *The luminescence properties and intramolecular energy transfer of rare earth complexes with aromatic carboxylic acids*. Chemical Research in Chinese Universities, 1998. **14**(3): p. 245-249.
13. Chen, W. and S. Fukuzumi, *Ligand-Dependent Ultrasonic-Assistant Self-Assemblies and Photophysical Properties of Lanthanide Nicotinic/Isonicotinic Complexes*. Inorganic Chemistry, 2009. **48**(8): p. 3800-3807.
14. Latva, M., et al., *Correlation between the lowest triplet state energy level of the ligand and lanthanide(III) luminescence quantum yield*. Journal of Luminescence, 1997. **75**(2): p. 149-169.
15. Aldrich, S., *Fiche produit du nicotinate de méthyle*. 2014. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/fluka/72420?lang=fr®ion=FR>.
16. Mattilsynet, *Risk profile Methyl nicotinate*. 2012: p. 21.
17. *Summary tables of biological tests*. Nature, 1950. **165**(4203): p. 804.
18. Yalkowsky, S.H., Dennenfelter, R.M., *Aquasol database of aqueous solubility*. 1992.
19. Neely W.B., B.G.E., *Introduction to environmental exposure to chemicals*. Environmental exposure to chemicals, 1985. **1**.
20. Perrin, D.D., *Dissociation constant of organics bases aqueous solution*. Butterworths, 1965: p. 42.
21. Zhou, C.X., et al., *Rapid pK(a) estimation using vacuum-assisted multiplexed capillary electrophoresis (VAMCE) with ultraviolet detection*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2005. **94**(3): p. 576-589.
22. Aldrich, S., *Fiche produit du para anisate de méthyle*. 2014. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/w267902?lang=fr®ion=FR>.
23. *Toxicological informations on Methyl p-anisate*. Food and cosmetics toxicology, 1976. **14**(5): p. 375-519.
24. Meylan, W.M. and P.H. Howard, *Bond contribution method for estimating Henry's law constants*. . Environmental Toxicology and Chemistry, 1991. **10**(10): p. 1283-1293.
25. Aldrich, S., *Fiche produit du phénylacétate de méthyle*. 2014. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/w273309?lang=fr®ion=FR>.
26. *Toxicological informations on Methyl phenylacetate*. Food and cosmetics toxicology, 1974. **12**(7-8): p. 807-1016.

27. Aldrich, S., *FDS Phénylacétate de méthyle*. 2012: p. 6.
28. Meylan, W.M., P.H. Howard, and R.S. Boethling, *Improved method for estimating water solubility from octanol water partition coefficient*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1996. **15**(2): p. 100-106.
29. Aldrich, S., *Fiche produit du 2-methoxybiphenyl*. 2014. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/196460?lang=fr®ion=FR>.
30. *Toxicological informations on 2-methoxy biphenyl*. *Food and cosmetics toxicology*, 1975. **13**(6): p. 603-923.
31. Aldrich, S., *FDS 2-methoxybiphényl*. 2012: p. 6.

CHAPITRE II

Etude de la complexation des marqueurs avec une molécule-sonde luminescente

I. Introduction

Dans le chapitre précédent, nous avons montré les caractéristiques importantes des composés marqueurs étudiés. La connaissance des propriétés physico-chimiques de ces composés souligne l'importance de certains éléments à prendre en compte pour la détection de l'acide nicotinique :

- L'acide nicotinique absorbe peu et dans l'ultraviolet, une gamme de longueur d'onde où un grand nombre de composés absorbent. Une détection optique directe par spectrophotométrie UV-visible n'est pas envisageable.
- L'acide nicotinique étant très peu volatil, les concentrations du composé dans l'haleine sont en conséquence très faibles. Sa détection requiert l'utilisation d'une méthode de détection optique très sensible. La détection de la fluorescence ou de la luminescence semble la méthode la plus indiquée.
- L'acide nicotinique n'est pas fluorescent et doit être détecté sélectivement parmi les quatre autres marqueurs ; de plus il est de loin le moins volatil des composés considérés. La réaction permettant de détecter l'acide nicotinique devra donc être la plus sélective possible.

Ces contraintes nous ont incités à nous orienter vers les réactions de complexation avec des métaux. Dans ce chapitre, nous justifierons le choix du complexe métallique servant de molécule sonde avec les études de complexation de l'acide nicotinique en solution. Nous étudierons en particulier les paramètres influençant la complexation entre l'acide nicotinique et le métal, tels que les concentrations des réactifs, le pH du milieu et la nature des tampons. Nous mesurerons à cet égard la luminescence des complexes en termes d'intensité et de durée de vie en fonction des paramètres pré-cités. Puis, nous évaluerons les performances de la méthode mise au point tout d'abord en milieu aqueux simple en présence de divers composés potentiellement interférents puis en milieux biologiques complexes tels qu'un milieu de culture, le condensat d'haleine, la salive ou encore l'urine.

II. Choix de la molécule-sonde et réactivité en solution

II.1 Choix de la molécule-sonde

Dans le cadre d'une mise au point d'un dispositif peu coûteux de diagnostic de la tuberculose pour la détection de l'acide nicotinique dans l'haleine des malades, nous avons choisi d'effectuer la détection par transduction optique. Ce choix a été guidé par le fait que les méthodes de transduction optique telles que l'absorption UV-visible ou la photoluminescence permettent une détection simple, rapide, sensible et sont d'un coût moindre que les techniques de chromatographie couplées à la

spectrométrie de masse. De plus, Il est relativement aisé de miniaturiser de tels systèmes. Comme il a été montré dans la partie précédente, l'acide nicotinique et les autres marqueurs absorbent dans des zones de longueur d'onde similaires dans l'UV avec des coefficients d'absorption peu élevés. Il n'est donc pas possible de détecter directement ces composés via la mesure de leur absorbance.

Des réactions colorimétriques avaient été envisagées avec les complexes de métaux de transition. Ces derniers peuvent adopter différentes configurations en équilibre en solution et présenter des propriétés de solvatochromisme ou de thermochromisme remarquables. C'est le cas des complexes CoCl_2 et CuBr_2 , qui ont fait l'objet d'études antérieures au laboratoire avec des supports celluloseux. La complexation de Co^{2+} ou de Cu^{2+} avec l'acide nicotinique conduit à un changement de coloration du bleu (CoCl_2) à rose (Co(AN)_2) ou de marron (CuBr_2) à vert (Cu(AN)_2) avec cependant une sensibilité insuffisante (quelques nanomoles) et une interférence notable avec la vapeur d'eau. Baser la détection sur le principe de l'absorption UV-visible n'est donc pas possible lorsqu'il s'agit de détecter des teneurs de l'ordre du picomole.

Nous nous sommes tournés vers des méthodes d'analyse fluorimétrique ou de luminescence dont la sensibilité est bien plus élevée que la mesure d'absorbance. Néanmoins, l'acide nicotinique n'étant pas luminescent, il a été nécessaire de trouver une réaction permettant d'exploiter sélectivement la complexation entre l'acide nicotinique et une espèce luminescente. C'est pourquoi le choix s'est orienté vers les réactions de complexation de l'acide nicotinique avec les lanthanides.

II.2 Complexation de l'acide nicotinique avec les lanthanides

Les lanthanides, de structure électronique $[\text{Xe}]6s^25d^14f^n$ avec n variant entre 0 et 14 du lanthane au lutécium, forment en solution aqueuse essentiellement des cations trivalents, notés Ln(III). La luminescence des ions lanthanides est attribuée aux transitions électroniques internes des électrons $4f$. Ainsi le lanthane dont l'orbitale f est vide et le lutécium dont l'orbitale f est pleine ne peuvent pas abriter des transitions électroniques. Les transitions $f-f$ faisant intervenir des orbitales de même symétrie sont interdites par la règle de sélection de Laporte ou règle de parité. Aussi le retour à l'état fondamental des ions excités est un processus défavorisé, ce qui confère aux états excités des durées de vie très longues de quelques centaines de μs voire quelques ms. Les électrons $4f$ sont très proches du noyau et n'interagissent pas ou peu avec les orbitales moléculaires du ligand. Ils sont très peu perturbés par l'environnement et produisent en retournant à l'état fondamental des raies d'émission fines et caractéristiques pour chacun des ions en fonction des niveaux d'énergie impliqués. Certains ions lanthanides émettent dans le visible : Eu(III)(transition $^5D_1 \rightarrow ^7F_2$) dans le rouge, Tb(III) (transition $^5D_4 \rightarrow ^7F_5$) dans le vert, Sm(III) ($^4G_{5/2} \rightarrow ^6H_{5/2}$) dans le orange, et Dy(III) (transition $^4F_{9/2} \rightarrow ^6H_{13/2}$) dans le jaune. D'autres émettent dans le proche infra-rouge : Nd(III), Er(III) et Yb(III). Leur intensité d'émission est, de manière qualitative, inversement proportionnelle à la différence d'énergie entre le niveau excité de l'ion Ln(III) le plus bas et son état fondamental. En effet, plus la différence entre ces deux niveaux est faible, plus l'état excité subit des désactivations non radiatives provenant des niveaux vibrationnels, qui sont nombreux dans les complexes organiques. Il faut donc choisir les éléments ayant la différence la plus élevée entre leur niveau fondamental et leur niveau excité le plus bas. Les ions les plus intéressants pour des applications sont donc les ions Eu(III) et Tb(III). Les valeurs recensées dans la littérature pour les transitions varient entre 17000 et 19000 cm^{-1} pour Eu(III) (18674 cm^{-1} [1], 17200 cm^{-1} [2] 17000 cm^{-1} [3]) et entre 20000 et 23000 cm^{-1} pour Tb(III) (20500 cm^{-1} , 21000 cm^{-1} [3] et 22956 cm^{-1} [4]).

Les ions lanthanides absorbent très peu et leur coefficient d'extinction molaire est de l'ordre de quelques $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$. Néanmoins, un phénomène particulier permet de palier à cet inconvénient. Il s'agit de « l'effet antenne » ou d'accumulation d'une énergie d'excitation d'un donneur avec transfert de celle-ci vers un accepteur. L'effet antenne est ici décrit avec la collecte des photons d'excitation des ligands organiques donneurs et l'augmentation de la luminescence d'un accepteur, l'ion lanthanide, lorsque ce dernier est porté dans un état excité par transfert de l'énergie d'excitation du donneur vers l'accepteur (Figure 16).

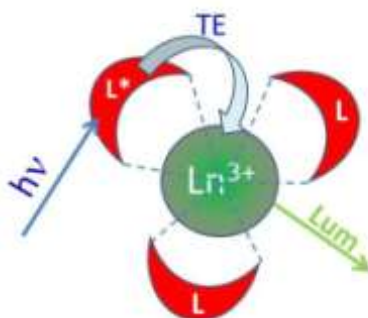


Figure 16. Représentation schématique de l'effet antenne correspondant au transfert de l'énergie d'excitation d'un ligand organique (L) excité vers un cation Ln^{3+} .

Les différentes voies de désactivation des états excités sont représentées dans le diagramme de Jablonski (Figure 17). L'énergie d'excitation du ligand organique peut être dissipée via la conversion interne ou la fluorescence ou encore par conversion intersystème vers l'état excité triplet. Ce dernier peut être désactivé par conversion interne et phosphorescence ou encore par transfert d'énergie vers un niveau d'énergie plus bas du cation. L'un des processus de désactivation à partir du niveau excité le plus bas du cation vers les niveaux vibrationnels j de l'état fondamental est la luminescence.

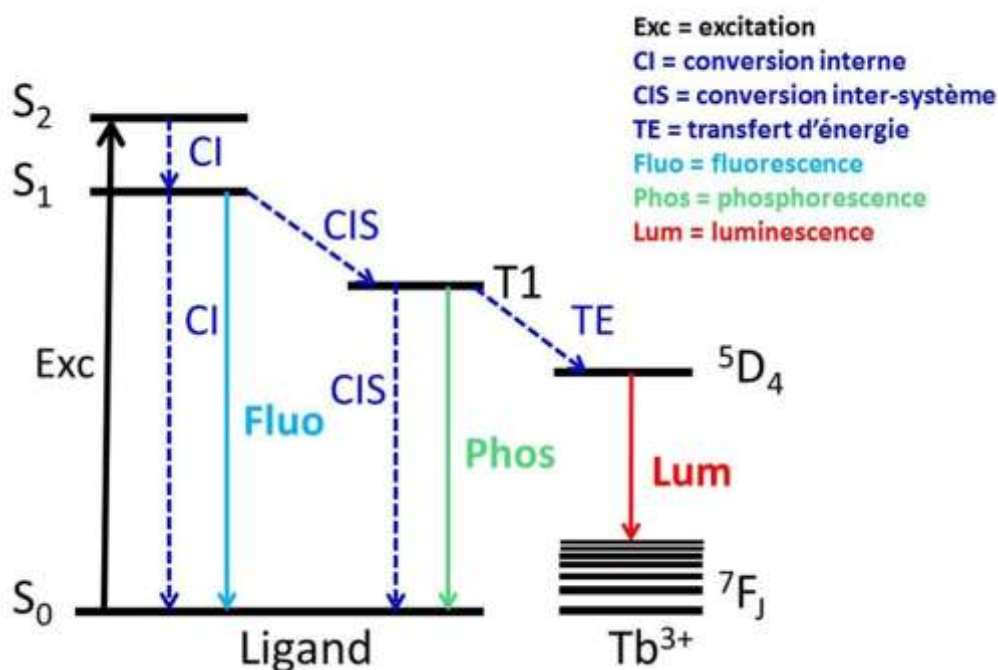


Figure 17. Diagramme de Jablonski décrivant les divers processus d'excitation du Ligand, de transfert d'énergie vers le cation de Tb et de désactivation des états excités.

Le transfert d'énergie du ligand vers le cation est favorisé si le ligand a une forte capacité d'absorption du rayonnement d'excitation (coefficient d'extinction molaire élevé), s'il est à proximité du cation métallique et qu'il possède un état triplet dont le niveau d'énergie est supérieur à l'état excité le plus bas du cation métallique. Pour Tb(III) par exemple, des estimations indiquent une énergie de l'état triplet du ligand idéalement située entre 22000 à 24000 cm^{-1} [2] ou une différence d'énergie avec le niveau excité du ligand de $3000 \pm 500 \text{ cm}^{-1}$ [1].

D'autres réactions peuvent également avoir lieu à l'état excité comme le transfert d'électron. Dans le cas de l'euprium qui possède une 2^{ème} valence, l'ion Eu(III) peut être réduit en Eu(II), par exemple dans une réaction de transfert de charge du ligand vers le métal. Une telle réaction ne peut avoir lieu avec Tb(III). Par ailleurs, dans le cadre de la détection de l'acide nicotinique, ce composé possède un état triplet dont le niveau d'énergie se situerait entre 23000 et 25000 cm^{-1} : 23923 cm^{-1} [1] et 24721 cm^{-1} [5]. Le calcul de la différence d'énergie dans le cas de Chen et al. [1] indique une différence de 3423 cm^{-1} , faisant de l'acide nicotinique une antenne acceptable pour le terbium. Pour ces diverses raisons, le choix final s'est porté sur l'ion Tb^{3+} .

Les ions trivalents de lanthanide sont des acides très durs dans la classification de Pearson des acides et bases durs et mous [6]. Cette dureté au sens de Pearson trouve son origine dans la nature des orbitales de valence 4f. En effet, ces orbitales sont "enfouies" dans le nuage électronique et les électrons de valence sont donc très peu sensibles à l'environnement chimique. Le champ cristallin est très faible, de l'ordre de quelques centaines de cm^{-1} , c'est-à-dire 10 à 100 fois plus faible que pour les métaux de transition. Une conséquence structurale est l'absence de directionnalité des liaisons métal-ligand. La position des différents ligands dans la sphère de coordination est conditionnée essentiellement par les interactions électrostatiques et stériques entre le cation métallique et les ligands, mais aussi entre les ligands. Ces derniers s'organisent au mieux autour du métal de façon à optimiser les interactions électrostatiques stabilisantes et à minimiser les interactions stériques répulsives. Les ions lanthanides forment des édifices stables préférentiellement avec des ligands durs, entre autres contenant des atomes donneurs d'oxygène (eau, carboxylates, alcoolates, α -dicétonates, ...) capables d'expulser les molécules d'eau.

La complexation de l'acide nicotinique avec l'ion Tb^{3+} a déjà fait l'objet d'études dans la littérature. Krasnova et al. [7] ont montré par des mesures de luminescence résolues temporellement avec la technique de mélange des réactifs en stopped-flow que la formation des complexes Tb(III)/AN est très rapide et que leur durée de vie est exceptionnellement longue (220 μs). Ce point est important car une mesure temporelle de la luminescence du complexe Tb(III)/AN pourrait permettre de s'affranchir de la fluorescence de fond provenant d'autres molécules organiques et de signaux Raman parasites. Toutes les raisons précitées nous ont incités à utiliser comme molécule-sonde un sel de terbium, $\text{Tb}(\text{NO}_3)_3$ et à baser la détection de l'acide nicotinique sur la mesure de la luminescence du complexe Tb(III)/acide nicotinique.

II.3 Propriétés optiques du nitrate de terbium en solution

II.3.1 Propriétés optiques du nitrate de terbium à l'état fondamental

Il est important de connaître les propriétés optiques du nitrate de terbium dans divers milieux aqueux qui pourront être utilisés par la suite. Les spectres d'absorption du nitrate de terbium à différents pH dans des solutions aqueuses tamponnées et non tamponnées ont été collectés (Figure 18). Le nitrate de terbium présente deux bandes d'absorption dans l'ultraviolet, dont les

maxima sont situés à 204 et 301 nm. La transition de plus basse énergie faisant intervenir les électrons de la couche 4f est de très faible intensité. Elle est 1400 fois moins intense que celle située à 204 nm dans l'eau ($\epsilon = 28000 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$). La transition électronique à plus basse énergie subit peu de modifications en fonction de l'environnement à l'exception du milieu très basique. La position du maximum d'absorption, 300 à 302 nm, ne varie pratiquement pas. Il en est de même pour le coefficient d'extinction molaire qui varie entre 20 et $22 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$.

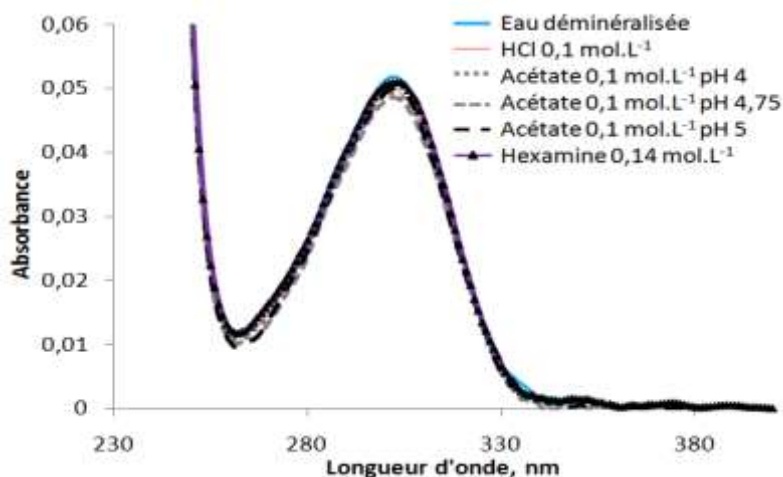


Figure 18. Spectre d'absorption UV-visible du nitrate de terbium $2,3 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ dans différents milieux aqueux acides non tamponnés et tamponnés.

Tableau 9. Caractéristiques spectrophotométriques du nitrate de terbium dans les solutions aqueuses non tamponnées et tamponnées.

Système	pH	λ_{max} (nm)	ϵ_{max} ($\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$)	λ_{max} (nm)	ϵ_{max} ($\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$)
Eau déminéralisée	4,5-5	302	21 ± 2	204	28000 ± 1400
Eau +HCl 0,1 mol.L ⁻¹	1,0	301	21 ± 2	204	27100 ± 1350
Tampon acétate 0,1 mol.L ⁻¹	4	301	22 ± 2	216	10450 ± 520
	4,75	301	22 ± 2	216	9020 ± 450
	5	301	22 ± 2	217	9020 ± 450
Tampon hexamine 0,14 mol.L ⁻¹	6,4	302	20 ± 2		

II.3.2 Propriétés optiques du nitrate de terbium à l'état excité.

Le spectre de luminescence du nitrate de terbium en solution tamponnée d'hexamine ($0,14 \text{ mol.L}^{-1}$) à pH 6,4 est présenté dans la Figure 19. Tb(III) présente 4 bandes d'émission dans le visible, centrées à 490, 544, 588 et 620 nm correspondant respectivement aux transitions $^5\text{D}_4 \rightarrow ^7\text{F}_6$, $^5\text{D}_4 \rightarrow ^7\text{F}_5$, $^5\text{D}_4 \rightarrow ^7\text{F}_4$ et $^5\text{D}_4 \rightarrow ^7\text{F}_3$. Dans la suite de l'étude, la luminescence sera uniquement suivie au niveau de la bande la plus intense, centrée à 544 nm.

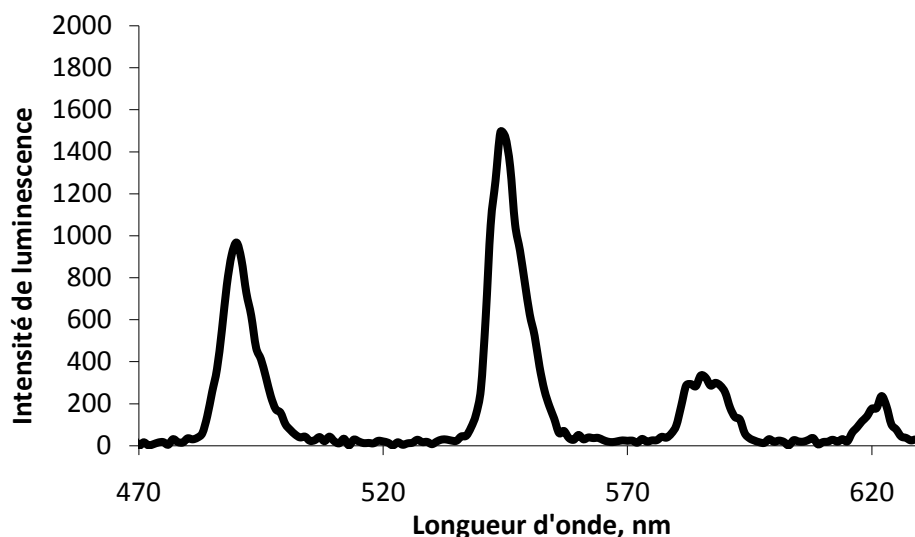


Figure 19. Spectre de luminescence de Tb(III) en solution tampon d'hexamine 0,14 mol.L⁻¹, pH 6,4

III. Réactivité de la molécule sonde en solution

Il s'agit tout d'abord d'étudier la réaction de complexation entre l'acide nicotinique et le nitrate de terbium en solution. Cette étude a pour objectif, dans un premier temps, de connaître l'évolution de la luminescence du nitrate de terbium en solution en fonction de sa concentration et du pH du milieu et notamment dans un milieu tamponné. En effet, Krasnova et al. ont montré que la vitesse de complexation de l'acide nicotinique avec le terbium peut être diminuée par la présence d'autres ligands L, pouvant former des complexes ternaires Tb(III)/AN-L. L'effet potentiel d'interférence de divers tampons (acétate et hexamine) sera donc examiné. Dans un deuxième temps, nous étudierons la luminescence du complexe Tb(III)/AN en fonction de la concentration de AN en solution, pour déterminer la limite de détection du complexe en solution. Ces études seront réalisées avec deux sources d'excitation, une lampe pulsée et un laser Nd-YAG avec des impulsions nanosecondes, pour la détermination des durées de vie de luminescence.

III.1 Propriétés optiques de Tb(NO₃)₃ et des complexes Tb³⁺/AN

Dans un premier, les spectres d'absorption du complexe de nitrate de terbium avec l'acide nicotinique en solutions aqueuses tamponnées et non tamponnées ont été collectés. Les concentrations de nitrate de terbium et d'acide nicotinique sont maintenues constantes et égales à 200 μmol.L⁻¹ et 4,1 μmol.L⁻¹, respectivement.

Milieux aqueux non tamponnés

Les spectres d'absorption des mélanges d'acide nicotinique et de nitrate de terbium dans des solutions aqueuses non tamponnées acides et basiques à pH 1, 4,5 et 13 ont été collectés. Pour l'obtention de ces pH, le nitrate de terbium a été ajouté respectivement à une solution d'acide chlorhydrique 0,1 mol.L⁻¹, à de l'eau déminéralisée et à une solution d'hydroxyde de sodium 0,1 mol.L⁻¹. Pour chaque solution aqueuse, le spectre du mélange a été comparé au spectre de chaque réactif.

Le spectre d'absorption du mélange est pratiquement égal à la somme des spectres d'absorption de chaque réactif, et ce quel que soit le milieu environnant (Figure 20 et Tableau 10).

Dans le milieu très basique, le complexe de terbium se trouve sous la forme de $Tb(OH)_3$, peu soluble dans l'eau, ce qui explique un élargissement des bandes d'absorption dû à la diffusion de la lumière.

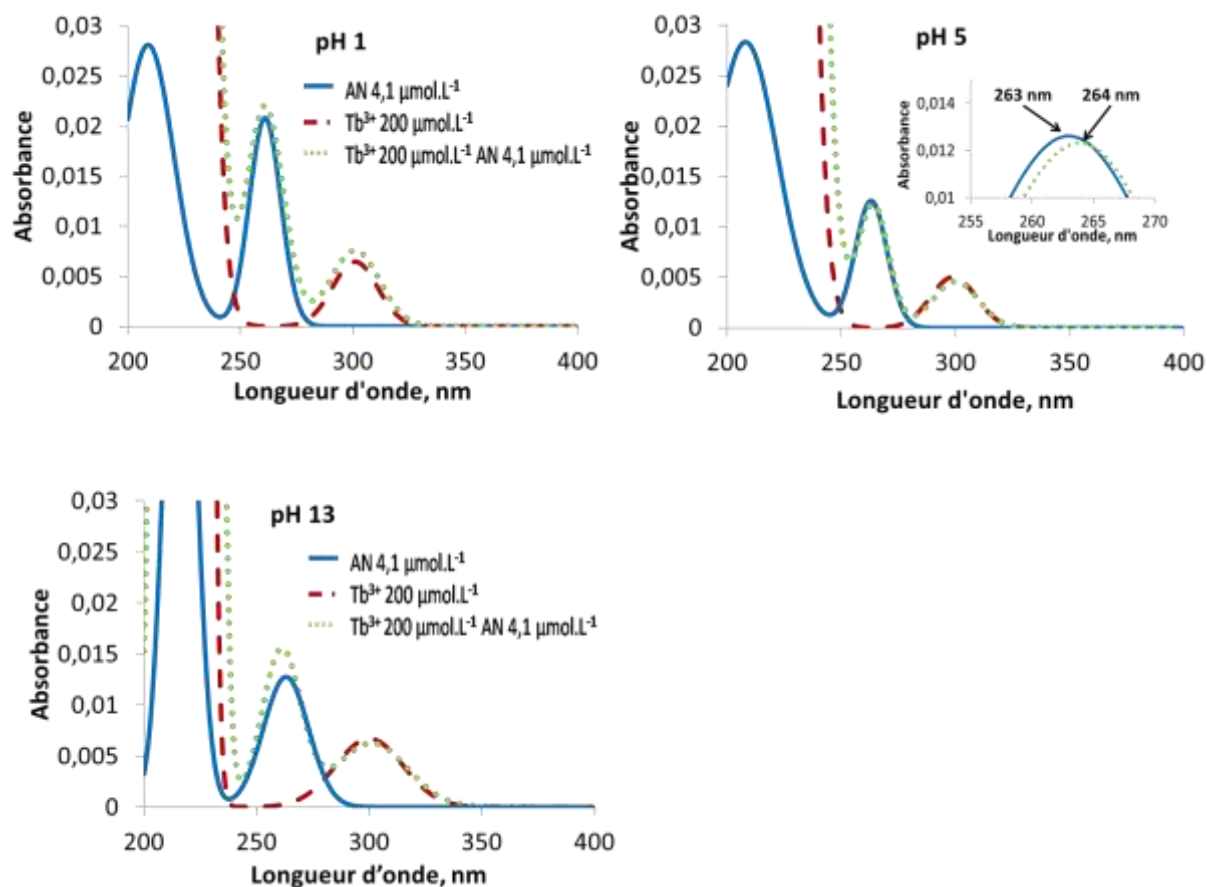


Figure 20. Spectres d'absorption UV-visible de l'acide nicotinique $4,1 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$, de $Tb^{3+} 200 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ et du complexe Tb^{3+}/AN en solution d'acide chlorhydrique $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, dans l'eau déminéralisée et dans une solution d'hydroxyde de sodium $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$. A pH 13, les spectres correspondent à ceux des espèces présentes dans la solution surnageante, une partie de $Tb(OH)_3$ ayant précipité.

Tableau 10. Caractéristiques spectrophotométriques de l'acide nicotinique, du nitrate de terbium et du complexe Tb^{3+}/AN en solutions aqueuses non tamponnées.

Système	pH	Tb^{3+}		AN	
		λ (nm)	ϵ ($\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$)	λ (nm)	ϵ ($\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$)
$Tb(NO_3)_3$ dans l'eau déminéralisée	4,5-5	302	22 ± 2		
$Tb(NO_3)_3$ dans l'eau + HCl $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$	1,0	301	22 ± 2		
AN dans l'eau + HCl $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$	1			261	4880 ± 240
AN dans l'eau déminéralisée	4,5-5			262	3550 ± 180
Complexe Tb^{3+}/AN dans l'eau + HCl $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$	1	300	34 ± 3	261	5100 ± 260
Complexe Tb^{3+}/AN dans l'eau	4,5-5	299	25 ± 3	263	3540 ± 180

Bien que les spectres d'absorption du mélange des réactifs ne permettent pas de conclure à la présence de complexes avec l'acide nicotinique, on peut subodorer que la complexation entre l'acide nicotinique et Tb^{3+} étant de nature ionique va dépendre fortement de la forme que va prendre l'acide nicotinique dans différents milieux aqueux lorsque le pH change. Ainsi, lorsque l'acide nicotinique se trouve sous la forme cationique à pH très acide, les charges identiques des deux cations se repoussent, ce qui devrait induire une diminution ou un empêchement de la

complexation. En revanche, dans l'eau déminéralisée et en solution d'hydroxyde de sodium, l'acide nicotinique est sous forme neutre et/ou sous forme anionique. Dans ces deux conditions, la complexation est plus favorable. Néanmoins, en solution très basique, $Tb(NO_3)_3$ se retrouve sous la forme de $Tb(OH)_3$ et le remplacement des OH^- par l'anion de l'acide nicotinique pourrait être plus difficile.

Dans la littérature, certains auteurs trouvent que les transitions électroniques des ligands peuvent être perturbées par leur complexation avec des lanthanides. Avec l'acide salicylique et l'acide benzoïque sous leur forme salicylate et benzoate, Lewandowski et al. [8] ont montré que la complexation entraîne un déplacement bathochrome du maximum de la bande d'absorption du ligand aromatique. Ainsi pour La, Nd, Dy et Yb un déplacement bathochrome de 3,7 (-665 cm^{-1}) à 4,3 nm (-771 cm^{-1}) est observé pour l'ion salicylate ($\lambda=234$ nm). Un effet similaire est observé avec l'ion benzoate, les décalages en longueur d'onde étant de l'ordre de 3,5 (-669 cm^{-1}) à 4,5 nm (-856 cm^{-1}) (benzoate : $\lambda=227$ nm). Dans une étude sur la complexation de l'acide salicylique avec Tb(III), Arnaud et al. [9] ont montré qu'un effet similaire peut être observé pour la transition de plus basse énergie situé à 352 nm, mais avec un déplacement très faible de l'ordre 1 nm (-80 cm^{-1}). Ces deux auteurs n'ont cependant pas comparé les spectres du mélange de réactifs à la somme des spectres des réactifs. Il est donc difficile de pouvoir prédire une complexation à partir de l'observation seule du spectre d'absorption du mélange de réactifs.

L'étude de la luminescence de Tb^{3+} en présence et en absence d'acide nicotinique va permettre de mettre en évidence la complexation entre les réactifs. La luminescence du nitrate de terbium et des complexes Tb^{3+}/AN est collectée dans un premier temps en mode de phosphorescence, dans les différentes solutions aqueuses. Les conditions expérimentales ont été détaillées dans le chapitre expérimental. Rappelons que la concentration de $Tb(NO_3)_3$ a été maintenue constante et égale à 200 $\mu mol.L^{-1}$ et que son absorbance à la longueur d'onde d'excitation, 260 nm, à cette concentration est égale $1,3 \cdot 10^{-3}$ dans l'eau déminéralisée pour un parcours optique de 1 cm. La source de lumière d'excitation est une lampe pulsée et l'échantillon est excité 50 fois avec un intervalle de 50 ms entre chaque flash. Après chaque flash d'excitation, la phosphorescence est collectée avec un délai de 30 μs pendant une durée de 2 ms. Chaque cycle excitation/collecte du signal dure 50 ms.

La Figure 21 présente les spectres de luminescence du nitrate de terbium et du complexe avec l'acide nicotinique obtenus dans les solutions aqueuses non tamponnées. La luminescence du nitrate de terbium dans l'eau, quel que soit le pH, est très faible avec une aire de phosphorescence du pic centré à 544 nm variant entre 300 et 800 unités. L'ajout de 4,1 $\mu mol.L^{-1}$ d'acide nicotinique (absorbance à 260 nm = 0,016) n'affecte pas la luminescence du terbium pour les solutions très acides et très basiques. On observe en revanche une augmentation de la luminescence dans l'eau à pH 5, avec une intensité multipliée par un facteur ~ 10 .

Ces observations sont attendues et rationalisées de la manière suivante. A un pH de 1, la concentration en ions H^+ est élevée mais n'influe pas sur la sphère de coordination du nitrate de terbium, constituée de molécules d'eau. La luminescence de $Tb(NO_3)_3$ n'est pas affectée. L'absence d'effet sur la luminescence lors de l'ajout d'acide nicotinique en milieu HCl 0,1 $mol.L^{-1}$ peut être expliquée en termes d'absence de complexation de Tb^{3+} par les molécules d'acide nicotinique. En effet, à pH 1, l'acide nicotinique est sous sa forme protonée $C_5H_5NCO_2^+$ ($pK_{a1} = 2,09$) [10]. L'acide

nicotinique ayant une charge de même signe que celle du cation Tb(III), la complexation est défavorisée par la répulsion électrostatique. La luminescence n'est alors due qu'au nitrate de terbium.

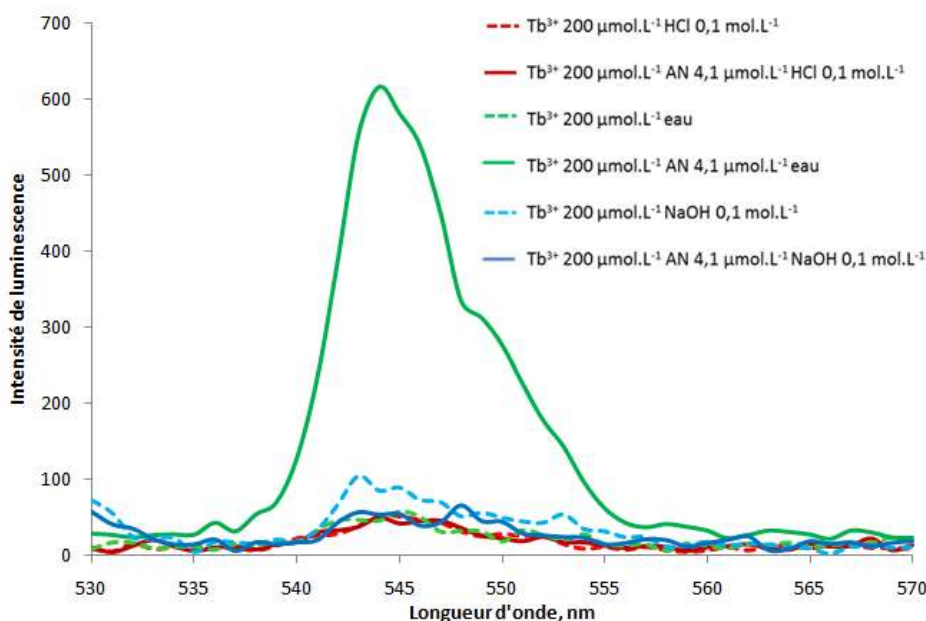


Figure 21. Spectres de luminescence du nitrate de terbium ($200 \mu\text{mol.L}^{-1}$) et de son complexe avec l'acide nicotinique ($4,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$) dans l'eau, une solution d'acide chlorhydrique $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ et dans une solution d'hydroxyde de sodium $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$.

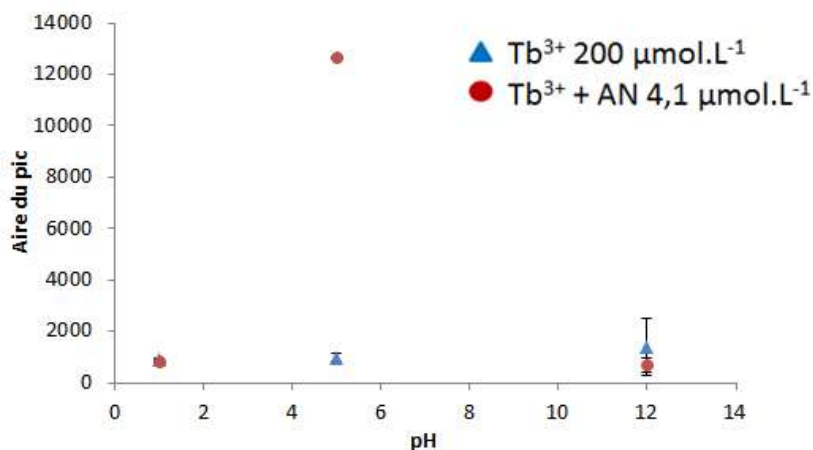


Figure 22. Aire du pic de luminescence du nitrate de terbium à 544 nm avant et après ajout d'acide nicotinique en solutions aqueuses acide ($\text{HCl}=0,1 \text{ mol.L}^{-1}$), neutre et basique ($\text{NaOH}=0,1 \text{ mol.L}^{-1}$).

A pH 12, la concentration des ions OH^- est élevée et la formation de $\text{Tb}(\text{OH})_3$ est favorisée. On observe dans ce cas une très faible variation, qui pourrait être due à la différence de rendement de phosphorescence du $\text{Tb}(\text{NO}_3)_3$ et du $\text{Tb}(\text{OH})_3$ dans l'eau. L'absence d'effet sur la luminescence du terbium lors de l'ajout de l'acide nicotinique peut être expliquée de la manière suivante : à pH 12, l'acide nicotinique est totalement déprotoné, mais est en concentration bien inférieure (~ 2400 fois moins) à celle des groupements hydroxyle HO^- présents en solution. Les groupements HO^- forment avec le terbium le complexe $\text{Tb}(\text{OH})_3$ hydraté, dont le rendement de luminescence serait aussi faible que celui de $\text{Tb}(\text{NO}_3)_3$ dans l'eau.

A pH 5, l'acide nicotinique se trouve sous sa forme neutre, en concentration plus élevée que les ions OH⁻ et peut entrer en compétition avec ces derniers pour la complexation du terbium. L'effet de l'acide nicotinique est double : en déplaçant les molécules d'eau, responsables de la désactivation de l'état excité de Tb³⁺, sa présence permet de diminuer le rendement de la voie non radiative de désactivation. Par ailleurs, par sa forte absorbance à 260 nm, l'acide nicotinique joue le rôle d'antenne pour la collecte des photons d'excitation dont l'énergie est transférée au Tb³⁺. Avec une concentration aussi faible que 4 μmol.L⁻¹, on observe bien l'existence d'une complexation du ligand avec Tb³⁺.

Milieux aqueux tamponnés

De l'étude de l'effet du pH sur la luminescence du Tb³⁺ dans les solutions aqueuses, il apparaît favorable de procéder au suivi de la luminescence de Tb³⁺ à un pH autour de 5.

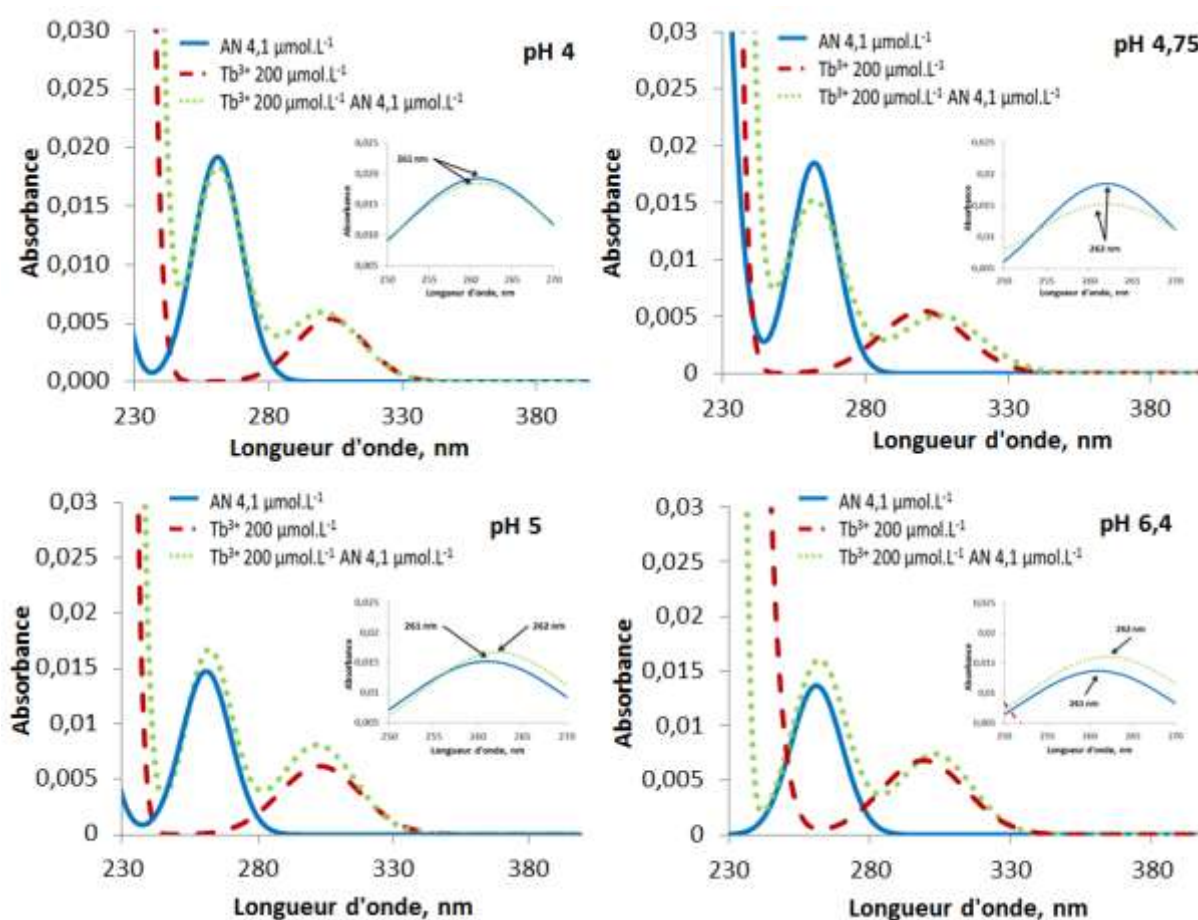


Figure 23. Spectres d'absorption UV-visible de l'acide nicotinique, de Tb³⁺ et du complexe Tb³⁺/AN dans des solutions tampons d'acétate 0,1 mol.L⁻¹ à pH 4, 4,75 et 5, et dans une solution tampon d'hexamine 0,14 mol.L⁻¹ à pH 6,4.

Pour cette raison, la luminescence du nitrate de terbium et du complexe avec l'acide nicotinique a été étudiée dans des solutions de tampon acétate, à des pH variant entre 4 et 5. Les résultats obtenus dans l'eau et le tampon acétate ont ensuite été comparés à ceux obtenus dans une solution tamponnée d'hexamine 0,14 mol.L⁻¹ avec un pH de 6,4.

Le spectre d'absorption UV-visible des mélanges d'acide nicotinique et de nitrate de terbium dans chaque solution tampon est comparé à ceux des réactifs dans le même milieu. Une diminution

de l'absorbance de l'acide nicotinique est observée à mesure que le pH de la solution augmente. A des valeurs de pH comprises entre 4 et 5, le couple $C_6H_5NO_2/C_6H_4NO_2^-$ est présent en solution. L'augmentation du pH induit une baisse de la concentration de la forme acide et une augmentation de la concentration de la forme basique. La forme basique ayant un coefficient d'extinction molaire plus faible, l'absorbance de l'échantillon diminue. Les spectres des mélanges d'acide nicotinique et de Tb^{3+} ne sont pas très différents de ceux correspondant à la somme des spectres des réactifs. Comme pour les solutions non tamponnées, il est difficile à partir uniquement de spectres d'absorption de conclure à une complexation d'AN avec Tb^{3+} dans les solutions tamponnées.

Tableau 11. Caractéristiques spectrophotométriques de l'acide nicotinique, du nitrate de terbium et du complexe Tb^{3+}/AN en solutions aqueuses tamponnées

Système	pH	Tb^{3+}		AN	
		λ (nm)	ϵ (mol ⁻¹ .L.cm ⁻¹)	λ (nm)	ϵ (mol ⁻¹ .L.cm ⁻¹)
$Tb(NO_3)_3$ dans tampon acétate 0,1 mol.L ⁻¹	4	301	22 ± 3		
	4,75	301	22 ± 3		
	5	301	21 ± 3		
$Tb(NO_3)_3$ dans tampon hexamine 0,14 mol.L ⁻¹	6,4	299	28 ± 3		
AN dans tampon acétate mol.L ⁻¹	4			261	4190 ± 210
	4,75			260	3780 ± 190
	5			261	3460 ± 170
AN dans tampon hexamine 0,14 mol.L ⁻¹	6,4			261	2970 ± 150
Complexe Tb^{3+}/AN dans tampon acétate 0,1 mol.L ⁻¹	4	305	22 ± 3	262	4100 ± 210
	4,75	303	22 ± 3	261	4060 ± 200
	5	301	23 ± 2	262	3410 ± 170
Complexe Tb^{3+}/AN dans tampon hexamine (0,14 mol.L ⁻¹)	6,4	304	19 ± 3	262	2850 ± 170

L'étude de la luminescence de Tb^{3+} en absence et en présence d'acide nicotinique va permettre de mettre en évidence cette complexation.

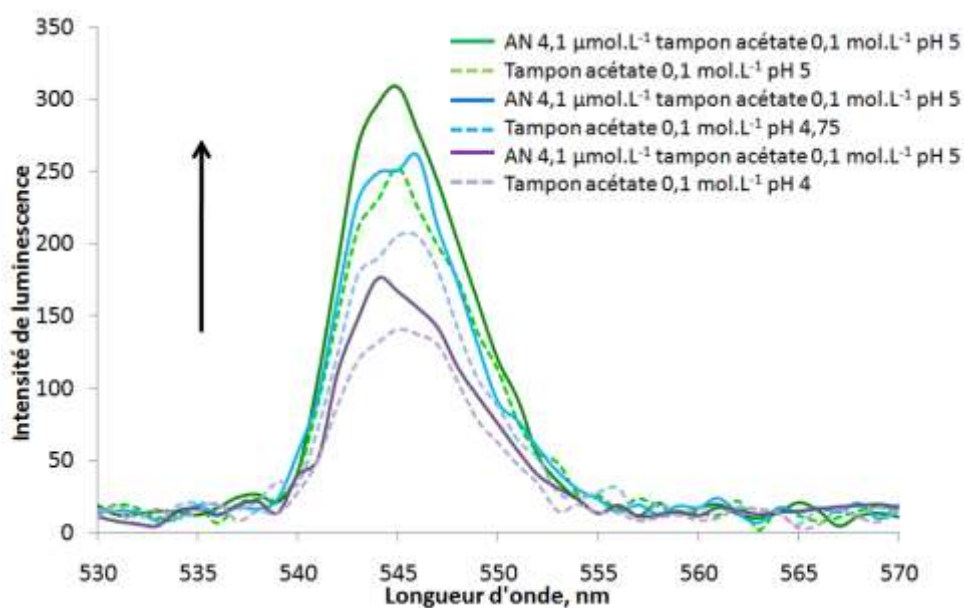


Figure 24. Comparaison des intensités de luminescence de Tb^{3+} et du complexe $Tb^{3+}-AN$ dans les différents tampons acétate. Tb^{3+} : 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, AN : 4,1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

Alors que la luminescence de Tb^{3+} est très faible dans une solution aqueuse à pH 5, la présence de molécules d'acide acétique/acétate de sodium ou d'hexamine dans les solutions tamponnées a pour effet d'exalter la luminescence de Tb^{3+} . Ces résultats semblent indiquer un déplacement des molécules d'eau de la cage de solvation du $Tb(NO_3)_3$, avec une complexation de Tb^{3+} par les molécules d'acide acétique sous leurs formes acide ou basique et les molécules d'hexamine présentes dans le tampon.

En milieu tamponné, avec un pH de 4, 4,75 et 5, le signal de luminescence du nitrate de terbium augmente linéairement avec le pH du milieu. Ces résultats peuvent être expliqués de la manière suivante : la valeur du pK_a du couple acide acétique /ion acétate étant de 4,75, le rapport A^-/AH augmente de 0,18, à 1 et à 1,8 avec l'augmentation du pH. La complexation de l'ion acétate avec $Tb(III)$ est favorisée par rapport à celle avec l'acide acétique du fait de la charge négative de l'ion acétate. De plus la complexation de l'ion acétate permet un déplacement des molécules d'eau de la sphère de coordination du terbium, ce qui réduit les phénomènes de désactivation non radiative.

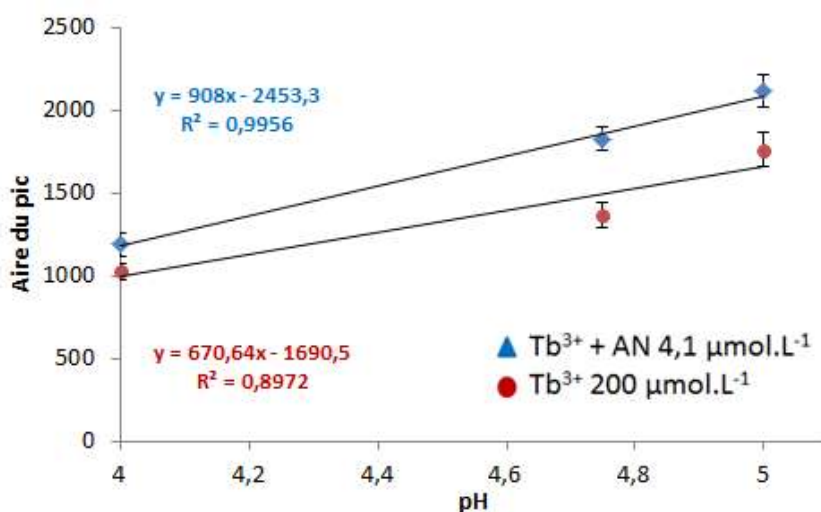


Figure 25. Signal de luminescence de $Tb(NO_3)_3$ et du complexe $Tb(NO_3)_3$ -AN en milieu tampon acétate $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ à pH 4, 4,75 et 5. Tb^{3+} : $200 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$, AN : $4,1 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$.

Ainsi, plus la concentration en ions acétate du milieu augmente, plus la luminescence augmente du fait d'une formation plus favorable de complexes mixtes de formule $Tb(NO_3)_3 \cdot x(CH_3COO)_x(H_2O)_y$. Lors de l'ajout de l'acide nicotinique à une concentration bien inférieure à celle des molécules de tampon, on observe de nouveau une augmentation de l'intensité de luminescence de Tb^{3+} . Celle-ci serait liée au remplacement des molécules d'eau restantes par l'acide nicotinique.

La luminescence de Tb^{3+} $200 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ dans le tampon hexamine ($0,14 \text{ mol.L}^{-1}$) est plus intense que celle mesurée dans le tampon acétate. Ce résultat peut être expliqué par la différence concentration des deux ligands. A partir des valeurs de pK_a de l'acide acétique et de l'hexamine protoné, respectivement égal à 4,75 et 4,89 [11], les concentrations respectives des deux ligands ont été calculées. Ainsi pour l'hexamine $0,14 \text{ mol.L}^{-1}$ dans une solution aqueuse à un pH de 6,4, la concentration d'hexamine base est de $0,136 \text{ mol.L}^{-1}$. Comparativement, pour l'acide acétique $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ dans une solution aqueuse à un pH de 5, la concentration d'ion acétate est de $0,064 \text{ mol.L}^{-1}$, soit 2 fois moins. Lors de la complexation de Tb^{3+} par les ions acétate et l'hexamine, les ligands expulsent des molécules d'eau de la sphère de coordination et contribuent ainsi à diminuer le processus de désactivation non radiative. Cet effet est plus important pour l'hexamine, dont la

concentration est élevée et dont la taille beaucoup plus volumineuse que celle de l'ion acétate favorise l'expulsion des molécules d'eau.

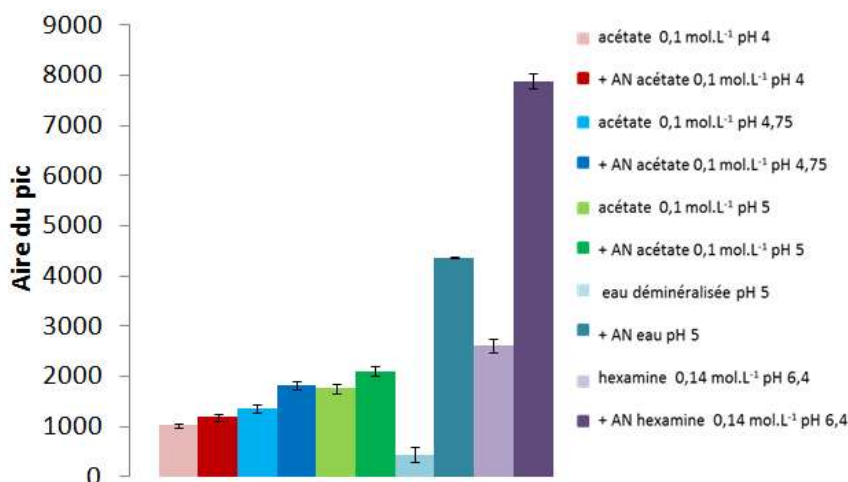


Figure 26. Luminescence de Tb^{3+} ($200 \mu mol.L^{-1}$) et de complexe Tb^{3+} -AN ($4,1 \mu mol.L^{-1}$) en milieux aqueux tamponnés et non tamponnés.

L'effet de l'ajout d'hexamine sur la luminescence d'ion Ln(III) avait été déjà montré par Walsh et al. pour $LaCl_3$ [12] et par Krasnova et al pour $Tb(NO_3)_3$ ([7]). L'étude de Walsh et al. avait permis de montrer l'influence d'ajouts successifs d'hexamine sur la luminescence du La(III) en milieu tampon borate $0,2 mol.L^{-1}$ à pH 6-6,5. Une augmentation de la luminescence du La(III) ($LaCl_3$ à $100 \mu mol.L^{-1}$) est observée pour des concentrations croissantes d'hexamine en solution, jusqu'à l'obtention d'une luminescence constante pour une concentration d'hexamine de $0,071 mol.L^{-1}$. Le rapport de concentration entre l'hexamine et le chlorure de lanthane est dans ces conditions de $0,071/0,0001 = 710$.

Sur la base des résultats de la littérature, nous avons mené diverses études en faisant varier la concentration de nitrate de terbium et celle de l'hexamine pour observer l'influence de ces deux paramètres sur la luminescence de Tb^{3+} et du complexe Tb^{3+} -AN. Les conditions expérimentales sont différentes de celles de Krasnova et al. La luminescence du nitrate de terbium à des concentrations comprises entre $0,05$ et $8 mmol.L^{-1}$ dans une solution d'hexamine de concentration $0,14 mol.L^{-1}$ a été collectée. Le pH de la solution d'hexamine était ajusté à 6,4. La comparaison des intensités de luminescence collectée à $544 nm$ est montrée dans la Figure 27.

Une augmentation de la luminescence de l'échantillon avec la concentration de Tb^{3+} est observée. La courbe correspondante est divisée en deux portions linéaires : de $0,05$ à environ $300 \mu mol.L^{-1}$ et de $\sim 0,5$ à $8 mmol.L^{-1}$, la luminescence augmentant plus rapidement dans la première portion que dans la deuxième. La concentration correspondante au point où les deux droites se croisent est $0,364 mmol.L^{-1}$. En ce point, le rapport de concentration entre l'hexamine et Tb^{3+} est de 385. Le changement de pente peut être expliqué de la manière suivante : la solution tamponnée d'hexamine a une absorbance de $0,013$ à $260 nm$. Pour des concentrations inférieures à $300 \mu mol.L^{-1}$, l'absorbance de Tb^{3+} est comprise entre $0,0002$ et $0,0012$, le rapport d'absorbance hexamine/ Tb^{3+} varie de 65 à 10,8. Dans ces conditions, l'hexamine joue le rôle d'antenne et transmet l'énergie absorbée à Tb^{3+} . La luminescence induite par l'excitation directe de Tb^{3+} est négligeable devant l'effet d'antenne induit par l'hexamine. Lorsque la concentration de Tb^{3+} dépasse $0,5 mmol.L^{-1}$, l'absorbance

de Tb^{3+} est comprise entre 0,0020 et 0,032. Le rapport d'absorbance hexamine/ Tb^{3+} varie de 0,65 à 0,41. La luminescence induite par excitation directe de Tb^{3+} devient majoritaire et la part de luminescence venant de l'effet antenne est diminuée, ce qui explique le changement de pente.

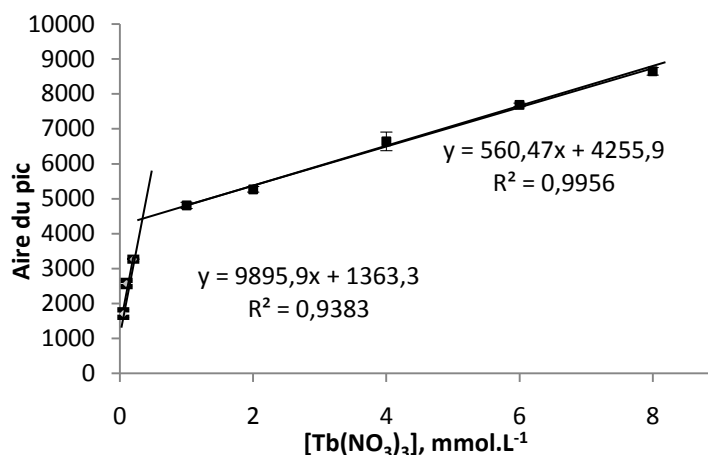


Figure 27. Luminescence de Tb^{3+} en fonction de la concentration de $Tb(NO_3)_3$. Tampon hexamine 0,14 mol.L⁻¹ pH 6,4.

Ce résultat montre que l'effet d'un FRET peut devenir minoritaire lorsque l'énergie d'excitation peut être directement collectée par la molécule sonde. Pour pouvoir corréler l'augmentation de luminescence à la concentration des molécules-donneur d'énergie, il faudrait tenir compte de cette compétition. Nous avons également vu que l'hexamine peut aussi jouer le rôle d'antenne pour Tb^{3+} , lorsque sa concentration est aussi élevée que 0,14 mol.L⁻¹. Cette constatation nous a amenés à entreprendre l'étude de l'influence de la concentration d'hexamine sur la luminescence de Tb^{3+} et du complexe Tb^{3+}/AN .

La luminescence du nitrate de terbium (200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) dans des solutions d'hexamine de concentrations 0,01, 0,1 0,14, 0,5, 0,71 et 1,4 mol.L⁻¹ a été collectée. Le pH des solutions d'hexamine était ajusté à 6,4. La luminescence de Tb^{3+} était de nouveau mesurée après ajout de 4,1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ d'acide nicotinique à chacune des solutions. La comparaison des intensités de luminescence collectée à 544 nm est montrée dans la Figure 28.

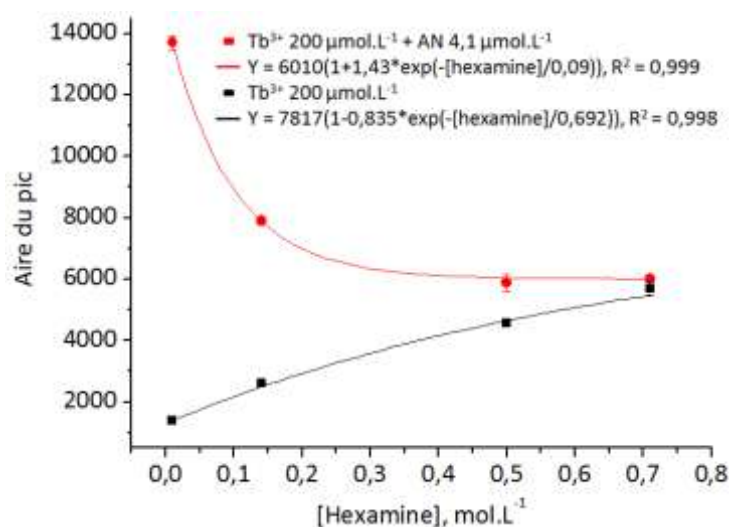


Figure 28. Luminescence de Tb^{3+} (200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) en fonction de la concentration d'hexamine en absence et en présence d'acide nicotinique (4,1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$).

Une augmentation de la luminescence du nitrate de terbium avec la concentration d'hexamine est observée. Cette augmentation semble atteindre un plateau aux alentours de 0,71 mol.L⁻¹. En présence d'acide nicotinique, on observe l'effet inverse : la luminescence de Tb³⁺, très intense avec la plus faible concentration d'hexamine (10⁻² mol.L⁻¹) diminue lorsque celle-ci augmente jusqu'à atteindre le même plateau au voisinage de 0,71 mol.L⁻¹. Ces observations sont rationalisées ainsi : le nitrate de terbium est un complexe de la forme Tb(NO₃)₃(H₂O)_y en solution aqueuse. L'ajout d'hexamine dans le milieu entraîne la formation d'un complexe de la forme Tb(NO₃)₃(hexamine)_x(H₂O)_{y-x} où l'hexamine expulse progressivement des molécules d'eau et remplace les ions NO₃⁻ à mesure que sa concentration augmente. L'expulsion des molécules d'eau et le remplacement des ions NO₃⁻ peut entraîner deux effets : une augmentation de la luminescence par réduction des désactivations non radiatives par les molécules d'eau et une augmentation de la luminescence due au transfert d'énergie de l'hexamine vers Tb³⁺. L'intensité de luminescence de Tb³⁺ atteint un plateau lorsque la concentration d'hexamine est suffisamment élevée pour induire la formation du complexe Tb(Hexamine)₄NO₃ ou Tb(Hexamine)₄H₂O.

Bunzli et al. ont montré qu'après dissolution d'un sel de nitrate de terbium Tb(NO₃)₃, 6 H₂O, seulement 3 molécules d'eau sont liées de manière monodente à Tb(III), faisant de NO₃⁻ un ligand bidentate dans cette situation. Ils concluent que le nombre de coordination du terbium dans le complexe est 9 [13]. Le complexe serait de la forme Tb(NO₃)₃(H₂O)₃. A partir de ces observations, il est possible de supposer que l'hexamine expulse 2 molécules d'eau pour complexer Tb(III), formant le complexe Tb(NO₃)₃(hexamine)(H₂O) (réaction 1 de la Figure 29). Après remplacement de tous les ions nitrate et des molécules d'eau par l'hexamine, la formule du complexe devient Tb(hexamine)₄(H₂O) ou Tb(hexamine)₄(NO₃) (réaction 2).

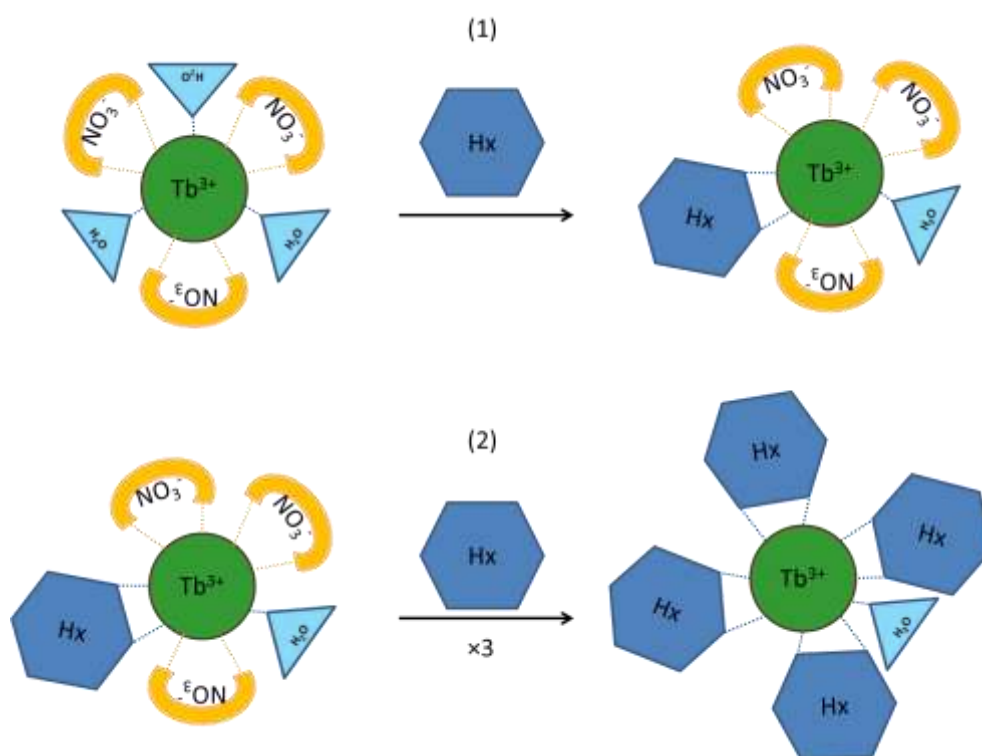


Figure 29. Représentation schématique de la complexation de l'hexamine avec le complexe de nitrate de terbium en solution aqueuse. Hx : hexamine. (1) Complexation d'une seule molécule d'hexamine, (2) saturation des sites de coordination par l'hexamine.

Lors de l'ajout d'acide nicotinique dans le milieu, celui-ci remplacerait avantageusement H_2O ou NO_3^- dans le 1^{er} cas. Dans le 2^{ème} cas, où l'hexamine est en large excès ($0,01 \text{ mol.L}^{-1}$ rapport de concentration de 2439), l'acide nicotinique viendrait remplacer la molécule d'eau ou l'ion nitrate résiduel. L'augmentation de la luminescence est due à la formation de complexe hybride $\text{Tb}(\text{NO}_3)_2(\text{hexamine})(\text{AN})(\text{H}_2\text{O})$ dans le 1^{er} cas et au complexe $\text{Tb}(\text{hexamine})_4(\text{AN})$ dans le second. L'AN agirait comme un ligand bidentate dans la 1^{ère} réaction et comme un ligand monodentate dans la 2^{ème} réaction.

L'acide nicotinique possède deux sites de complexation : sur le carboxylate et sur l'azote du cycle pyridine. La Figure 30 présente les quatre modes de coordination de l'acide nicotinique au centre métallique qui ont été proposés dans la littérature: les modes de coordination monodentes (a et b), bidentes, sur le même cation métallique (c) et sur deux cations différents (d et e) et tridentes sur deux ou trois cations métalliques (f et g).

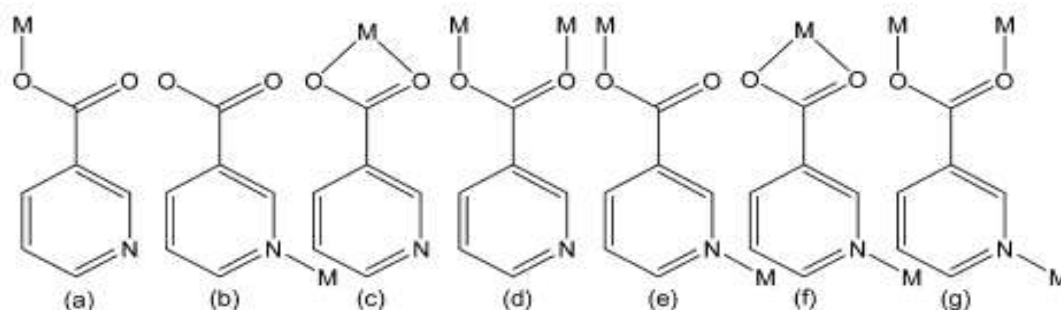


Figure 30. Les différents modes de coordination de l'acide nicotinique. [14]

Chen montre également que la coordination bidentate est favorisée (c et d) en particulier lorsqu'il fait intervenir deux cations métalliques. Ce résultat avait été préalablement montré par Moore en 1971 [15]. Les complexes ainsi formés sont des complexes à deux centres métalliques de la forme $\text{Tb}_2(\text{AN})_6(\text{H}_2\text{O})_4$, comme présenté sur la Figure 31.

Ce complexe a été formé par la réaction dans un flacon de 50 mL de 1 mmol de TbCl_3 (concentration $0,02 \text{ mol.L}^{-1}$) avec 2 mmol d'acide nicotinique ($0,04 \text{ mol.L}^{-1}$). Le mélange a ensuite été placé dans un bain à ultrasons pendant trois heures. Une structure cristalline du complexe a pu être isolée et déterminée aux rayons X. Le cercle bleu indique une molécule d'acide nicotinique complexée de manière bidentate sur un seul cation, le cercle rouge indique une molécule d'acide nicotinique complexée à deux cations. Chaque cation est entouré de 8 atomes d'oxygène : 2 proviennent de molécules d'acide nicotinique liées par les deux oxygènes de la fonction acide, 4 proviennent d'une fonction acide carboxylique formant un pont entre deux cations et les deux derniers atomes d'oxygène proviennent de molécules d'eau. Le nombre de coordination du terbium est alors de 8. Cependant, Chen et al. ont effectué cette étude en utilisant l'acide nicotinique comme seul ligand.

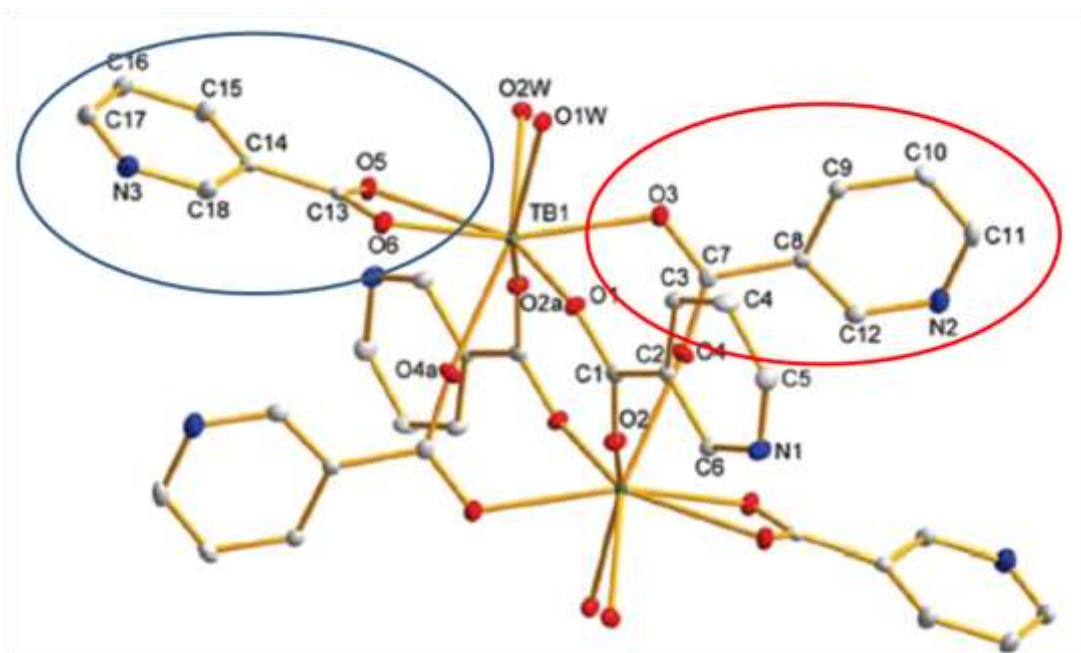


Figure 31. Représentation du complexe $Tb_2(AN)_6(H_2O)_4$ de l'étude de Chen et al. En vert : Tb^{3+} , en blanc : les atomes de carbone, en rouge les atomes d'oxygène et en bleu les atomes d'azote. [14]

D'autres études ont montré que la présence d'un second ligand peut modifier la conformation du complexe. Dans le cas de l'acide nicotinique, la présence d'un second ligand favoriserait la formation d'un complexe monométallique de la forme $Ln(AN)_3(L)_x$. Lenaerts et al. ont formé un complexe dimétallique $Tb_2(AN)_6(H_2O)_4$ et l'ont couplé à un composé dérivé de la 1,10 phénanthroline dans une matrice de silice formée par procédé Sol Gel. Le couplage a conduit à la formation du complexe monométallique $Tb(AN)_3(phen)(H_2O)_2$ comme présenté sur la figure suivante.

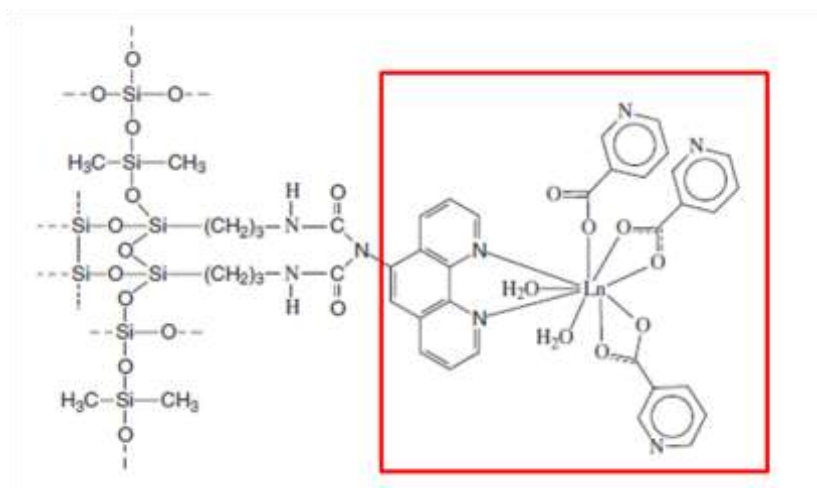


Figure 32. Formation d'un complexe ternaire entre Tb^{3+} , l'acide nicotinique et le dérivé de la 1,10 phénanthroline [3].

Le complexe $Tb_2(AN)_6(H_2O)_4$ a été formé par la réaction de 8,122 mmol d'acide nicotinique et de 1,15 mmol de $Tb(NO_3)_3 \cdot 5 H_2O$ dans un flacon de 25 mL. Le complexe ternaire a été formé en faisant réagir $6,05 \cdot 10^{-3}$ mmol du complexe binaire avec $1,58 \cdot 10^{-3}$ mmol du dérivé de phénanthroline dans un flacon de 20 mL. Une partie de cette solution a ensuite été utilisée pour la préparation de matrices Sol Gel.

On remarque que la 1,10 phénanthroline est un ligand bidentate, le composé ligande le cation métallique par les deux atomes d'azote de sa structure. Deux molécules d'eau sont toujours coordonnées au cation métallique. Enfin, trois molécules d'acide nicotinique sont liées à Ln(III). Le résultat le plus remarquable concerne les deux modes de coordination de l'acide nicotinique dans ce complexe monométallique. Il a été montré que dans un complexe bimétallique $Tb_2(AN)_6(H_2O)_4$, l'acide nicotinique se coordine majoritairement de manière bidente sur deux centres métalliques (Figure 32). En effet, sur les 6 molécules d'acide nicotinique incorporées dans le complexe, 4 sont liées de manière monodente et seulement deux de manière bidente. Pour un complexe monométallique, deux molécules d'acide nicotinique sont liées de manière bidente et une seule de manière monodente. Le nombre de coordination est de 9 pour le cation lanthanide dans ces conditions. Dans le cas de la complexation de l'acide nicotinique à Tb^{3+} en présence d'hexamine, nous savons que l'hexamine est un ligand bidentate. Un complexe de formule $Tb(NO_3)_2(\text{hexamine})(AN)(H_2O)$ peut être formé.

Comparativement aux données de la littérature, les structures que nous avons proposées avec l'acide nicotinique agissant comme un ligand bidentate ou monodentate semblent raisonnables.

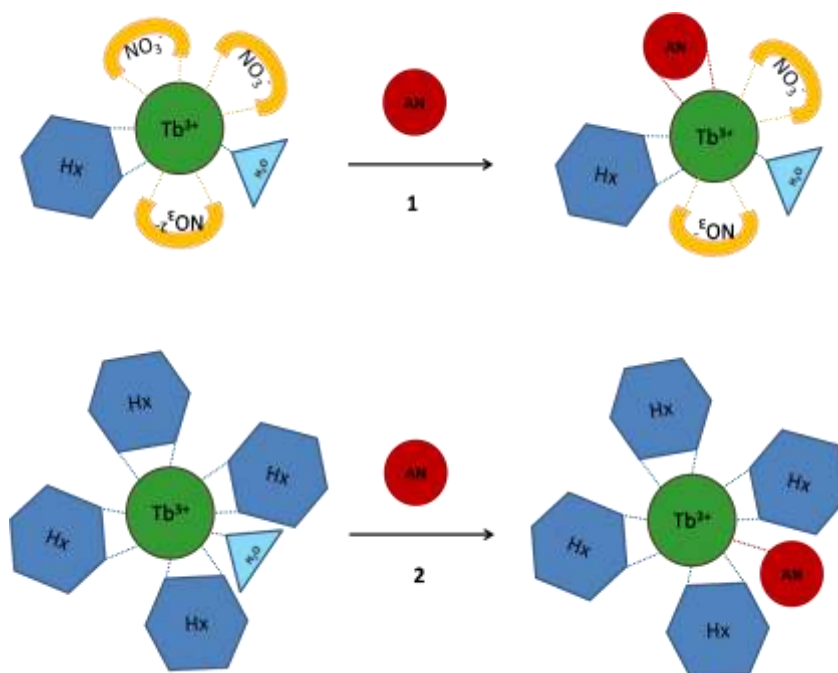


Figure 33. Représentation schématique de la complexation de l'acide nicotinique à Tb^{3+} en présence d'hexamine en faible concentration (haut) ou en excès (bas).

Jusqu'ici, nous avons montré que l'acide nicotinique pouvait avantageusement remplacer NO_3^- et H_2O en permettant une augmentation conséquente de l'intensité de luminescence de Tb^{3+} . Nous allons maintenant déterminer le domaine d'action de l'acide nicotinique dans différents environnements.

III.2 Dosage de l'acide nicotinique

Deux concentrations de nitrate de terbium ont été choisies pour cette étude : $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$ et 4 mmol.L^{-1} (rapport de concentration de 20). Une première concentration de $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$ a été choisie pour pouvoir observer l'effet d'antenne lors de la complexation de Tb^{3+} par l'acide nicotinique. En effet, il est nécessaire que l'absorbance de $Tb(NO_3)_3$ soit négligeable devant celle de

l'acide nicotinique. Une 2ème concentration plus élevée (4 mmol.L^{-1}) de $\text{Tb}(\text{NO}_3)_3$ a été choisie pour reproduire les conditions expérimentales de Krasnova et al. à titre de comparaison de la méthode d'analyse. Nous étudierons deux milieux tamponnés à pH 6,4 avec des concentrations d'hexamine égales à $0,01$ et $0,14 \text{ mol.L}^{-1}$.

III.2.1 Dosage de l'acide nicotinique dans les solutions diluées de $\text{Tb}(\text{NO}_3)_3$

a) Tampon hexamine $0,14 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 6,4.

Des ajouts de volume constant ($40 \mu\text{L}$) d'acide nicotinique ont été effectués à partir de solutions mères concentrées. Les concentrations d'acide nicotinique dans le volume final (3 mL) sont comprises entre 10 nmol.L^{-1} à $500 \mu\text{mol.L}^{-1}$. L'évolution de l'intensité de la raie de luminescence de Tb^{3+} à 544 nm en fonction de la concentration d'acide nicotinique est montrée dans la Figure 34 et la Figure 35.

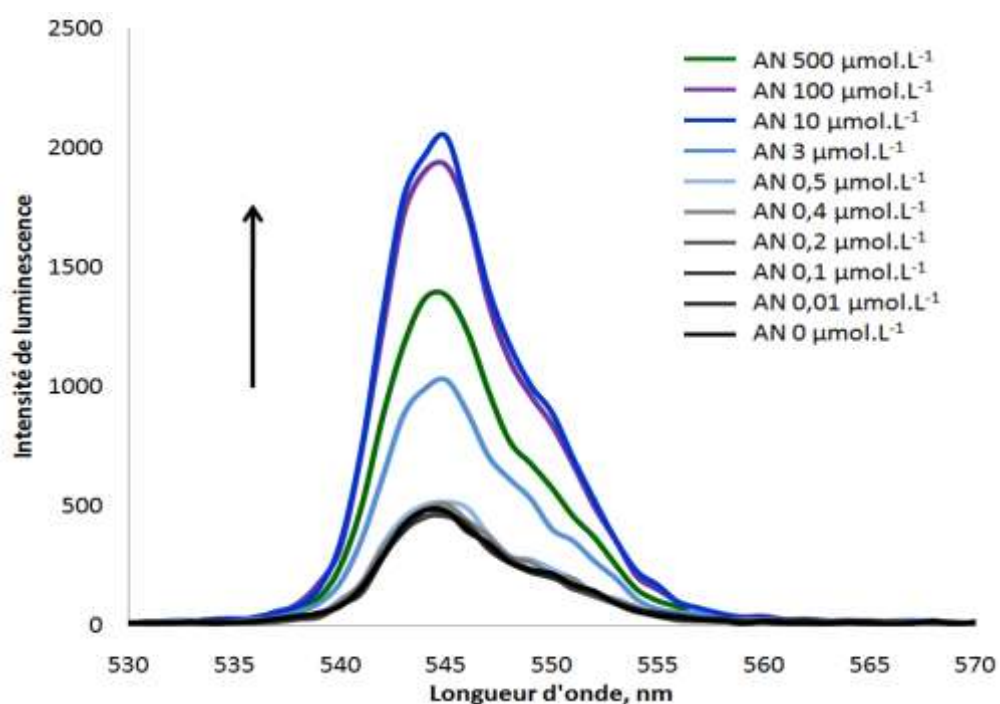


Figure 34. Spectres de luminescence de Tb^{3+} ($200 \mu\text{mol.L}^{-1}$) en fonction de la concentration d'acide nicotinique. AN : $0,01$ - $500 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Milieu tamponné à l'hexamine $0,14 \text{ mol.L}^{-1}$.

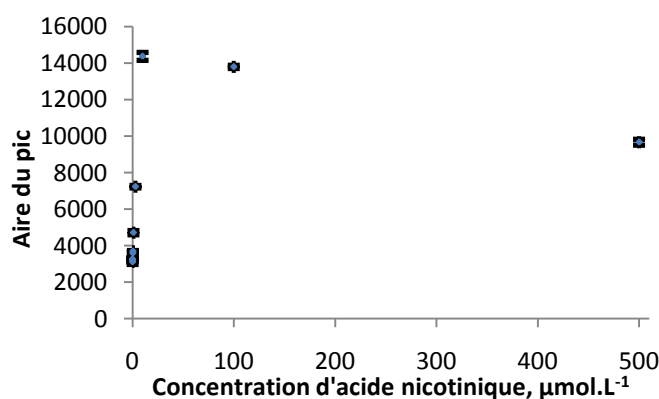


Figure 35. Aire des pics de luminescence de Tb^{3+} ($200 \mu\text{mol.L}^{-1}$) en fonction de la concentration d'acide nicotinique. Milieu tamponné à l'hexamine $0,14 \text{ mol.L}^{-1}$.

L'augmentation de la luminescence n'est pas linéaire sur toute la gamme de concentrations d'acide nicotinique. Le signal de luminescence augmente linéairement en fonction de la concentration entre 0,2 et 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, puis semble stable avant de rediminuer pour des concentrations en acide nicotinique supérieures à 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

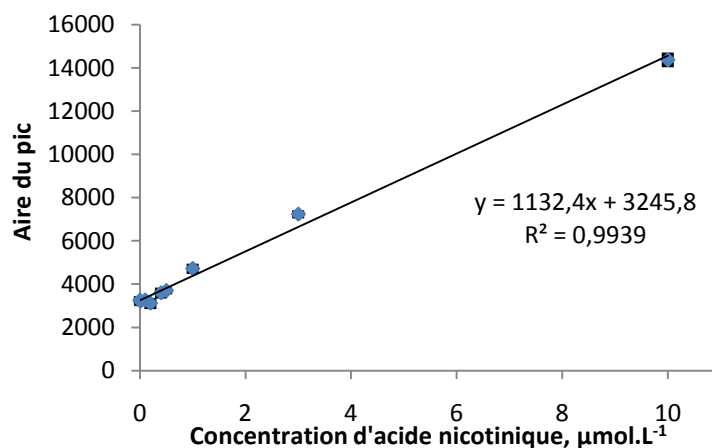


Figure 36. Gamme de linéarité de la méthode. Tb^{3+} : 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, AN : 0,01-10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Milieu tamponné à l'hexamine 0,14 mol.L^{-1} .

Entre 0,2 et 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, chaque molécule d'acide nicotinique ajoutée complexe Tb^{3+} en remplaçant la molécule d'eau ou de NO_3^- et favorise l'effet antenne. En effet, à la concentration de 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, l'acide nicotinique a une absorbance de 0,029 à 260 nm alors que celle du nitrate de terbium (200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) est seulement de 0,0002. Lorsque la concentration d'AN augmente de 100 à 500 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, l'absorbance à 260 nm augmente de 0,29 à 1,45 sur un parcours optique de 1 cm. L'excitation de la solution n'est plus homogène le long du parcours optique, induisant un gradient de concentration des espèces excitées dans la solution. Ce phénomène appelé « effet de peau » est d'autant plus important que l'absorbance est élevée. Ainsi la lumière d'excitation peut être complètement absorbée dans les premiers mm de la cuve. La luminescence étant collectée perpendiculairement au faisceau d'excitation, cet effet induit une diminution « artéfactuelle » de la luminescence. Pour l'obtention d'une excitation homogène sur un parcours optique de 1 cm, la densité optique de la solution ne devrait pas dépasser une valeur de $\sim 0,1$. Pour une valeur d'absorbance de 0,1, la concentration correspondante d'acide nicotinique est de 35 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Le dosage de l'acide nicotinique est possible dans ces conditions jusqu'à environ 35 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ d'acide nicotinique. Nous verrons par la suite que l'effet d'antenne est linéaire pour des concentrations plus élevées d'acide nicotinique, lorsque la source de lumière d'excitation est un laser nanoseconde.

b) Tampon hexamine 0,01 mol.L^{-1} pH 6,4

Des ajouts de volume constant (40 μL) d'acide nicotinique ont été effectués à partir de solutions mères concentrées. Les concentrations d'acide nicotinique dans le volume final (3 mL) sont comprises entre 10 nmol.L^{-1} à 500 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. La molarité de l'hexamine était 0,01 mol.L^{-1} . Lorsque la concentration d'hexamine est de 0,01 mol.L^{-1} , on observe lors du dosage de l'acide nicotinique deux phénomènes. Le premier, similaire à celui observé avec une concentration plus élevée d'hexamine de 0,14 mol.L^{-1} , est une augmentation de la luminescence de Tb^{3+} avec l'augmentation de faibles concentrations d'AN. Notons toutefois que cet effet est exalté en milieu dilué d'hexamine.

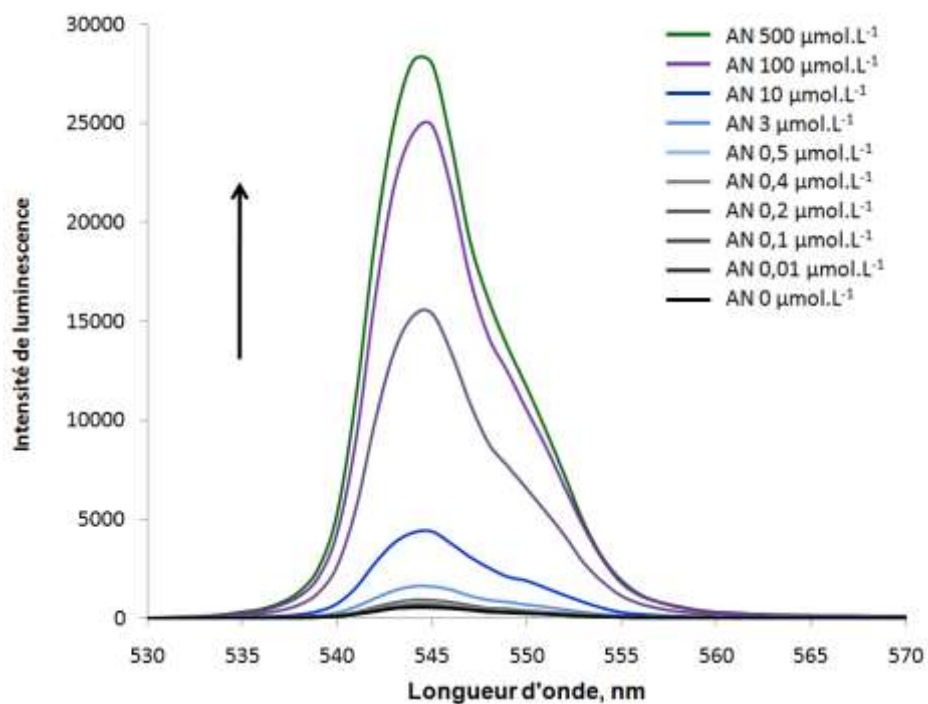


Figure 37. Spectre de luminescence du complexe nitrate de terbium ($200 \mu\text{mol.L}^{-1}$) en fonction de la concentration d'acide nicotinique ($0,01 - 500 \mu\text{mol.L}^{-1}$). Tampon hexamine $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 6,4.

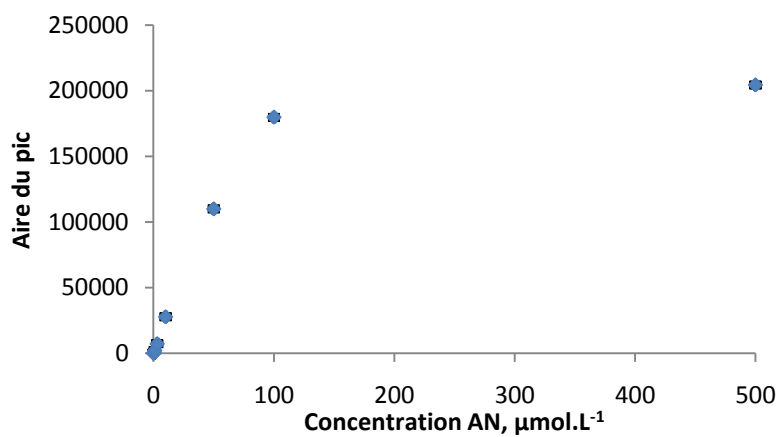


Figure 38. Aire des pics de luminescence du nitrate de terbium en fonction de la concentration en acide nicotinique. Milieu tamponné à l'hexamine $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$, pH=6,4.

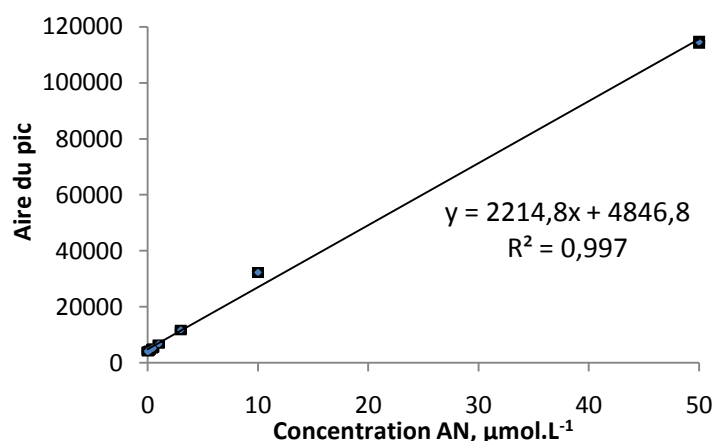


Figure 39. Gamme linéaire de la méthode de dosage de l'acide nicotinique en solution. Milieu tamponné à l'hexamine 0,01 mol.L⁻¹, pH = 6,4.

Ce résultat confirme ceux obtenus précédemment lors de l'étude de la luminescence de Tb³⁺ en fonction de la concentration d'hexamine en absence et en présence d'AN 4,1 µmol.L⁻¹ (Figure 28). A cette concentration d'hexamine, les complexes présents dans la solution sont de la forme Tb(NO₃)_x(Hexamine)_y(H₂O)_{z-x-y} et AN vient remplacer avantageusement l'ion NO₃⁻ et déplacer la sphère d'hydratation du complexe pour former des complexes de la forme Tb(AN)_x(Hexamine)_{y-x}.

Il est possible dans ce cas de doser l'acide nicotinique dans un domaine de concentration de 0,01 à 50 µmol.L⁻¹. La limite de détection d'acide nicotinique dans ces conditions est estimée à 400 nmol.L⁻¹ soit ~7 ppb (voir calcul dans l'Annexe du chapitre II). Au-delà de 50 µmol.L⁻¹, on observe le même phénomène décrit précédemment, dû à l'absorption des photons d'excitation dans les premiers millimètres de la cuve optique, entraînant un gradient de concentration des espèces excitées et par conséquent une intensité de luminescence « artéfactuellement » diminuée. Ce phénomène, lié ici à l'augmentation de la concentration d'acide nicotinique, est également valide dans le cas de l'augmentation de la concentration de Tb(NO₃)₃ comme nous allons le voir.

III.2.2 Dosage de l'acide nicotinique dans les solutions concentrées de Tb(NO₃)₃

Selon Krasnova et al. [7], la quantification de l'acide nicotinique dans les différents échantillons alimentaires peut être effectuée avec une concentration de nitrate de terbium de 4 mmol.L⁻¹. Nous avons reproduit ces mêmes conditions opératoires, en milieu tamponné avec un pH de 6,4 et une concentration d'hexamine de 0,14 mol.L⁻¹.

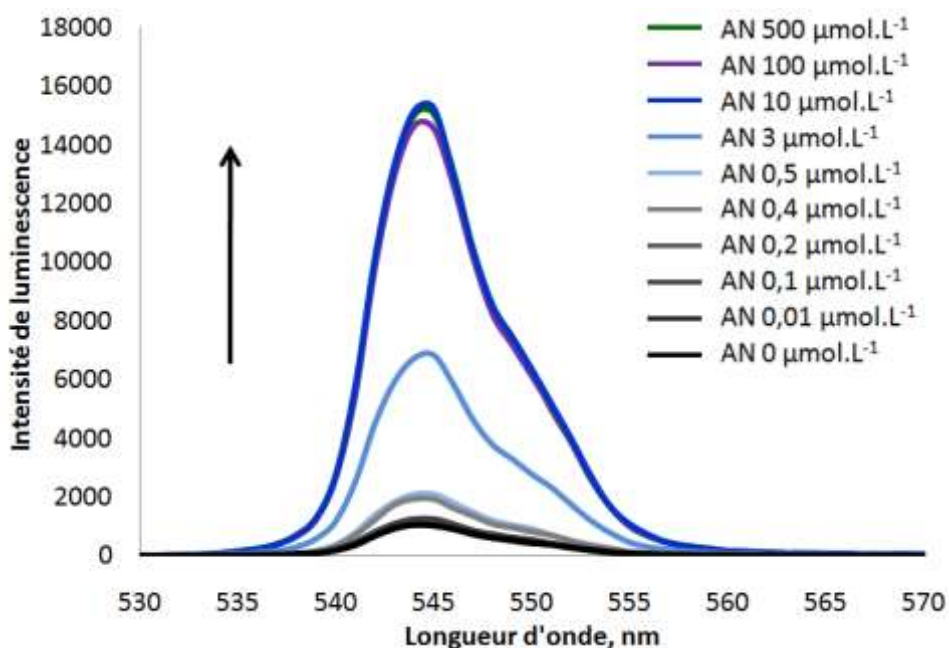


Figure 40. Spectres de luminescence du complexe nitrate de terbium (4 mmol.L^{-1}) en fonction de la concentration d'acide nicotinique. Milieu tamponné à l'hexamine $0,14 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 6,4.

On observe une augmentation de la luminescence de Tb^{3+} pour les faibles concentrations d'acide nicotinique. A partir d'une concentration de $10 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$, l'intensité de la raie à 544 nm ne change plus, même pour une concentration aussi élevée que $500 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$.

La limite de détection de l'acide nicotinique avec une concentration de 4 mmol.L^{-1} de nitrate de terbium et une solution tamponnée d'hexamine à $0,14 \text{ mol.L}^{-1}$ est de 400 nmol.L^{-1} . L'absorbance à 260 nm apportée par $\text{Tb}(\text{NO}_3)_3$ $4 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ est égale à 0,016. Cette valeur est équivalente à l'absorbance de l'acide nicotinique $4,1 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$. La luminescence de Tb^{3+} proviendrait essentiellement de l'excitation directe de Tb^{3+} pour les très faibles concentrations d'AN, inférieures à $1 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$, qui correspondent à peu près à la limite de détection donnée par Krasnova et al. de $0,240 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$.

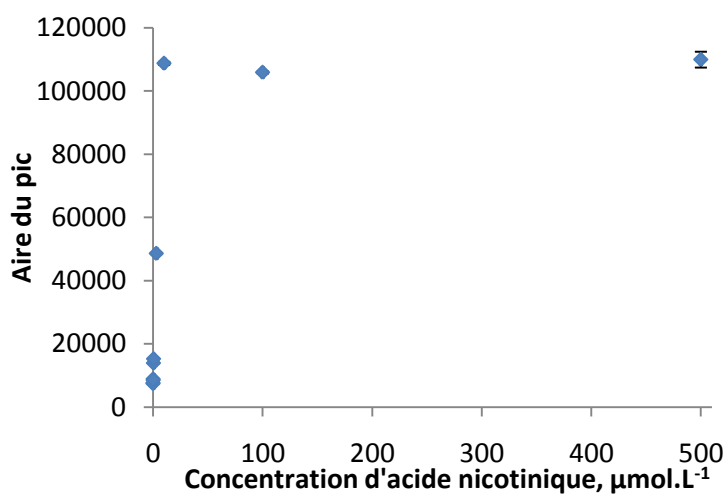


Figure 41. Aire des pics de luminescence du complexe nitrate de terbium (4 mmol.L^{-1}) en fonction de la concentration d'acide nicotinique. Milieu tamponné à l'hexamine $0,14 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 6,4.

Le domaine de linéarité du dosage, si l'on conserve une cuve optique de 1 cm, serait autour de $40 \mu\text{mol.L}^{-1}$ d'AN. Krasnova et al. obtiennent une linéarité dans un domaine plus large de concentration d'AN en utilisant une cellule de mélange de parcours optique 1 cm. Ces auteurs, utilisent la méthode de stopped-flow avec une lampe de Xe pulsée de 7 W. La lampe utilisée pour cette étude est une lampe Xe pulsée de 20 W.

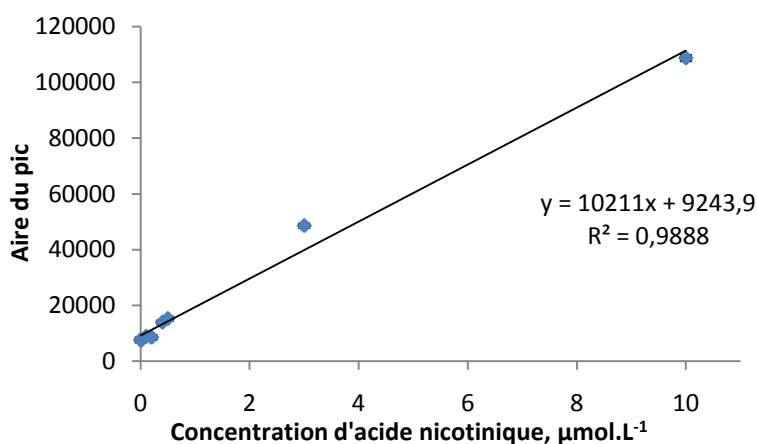


Figure 42. Gamme de linéarité de la méthode. Tb^{3+} : 4 mmol.L^{-1} , AN : $0,01\text{-}10 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Milieu tamponné à l'hexamine $0,14 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 6,4.

La différence observée concernant la gamme linéaire obtenue avec celle de Krasnova pourrait provenir de paramètres expérimentaux différents : la différence de puissance des lampes, le nombre de flash utilisés pour l'excitation des échantillons, l'effet de la présence d'un autre ligand, l'éthylène diamine tétraacétate, EDTA, sur la linéarité de la méthode qui n'est pas explicité.

La linéarité de la méthode de détection de l'acide nicotinique est bien meilleure pour une faible concentration d'hexamine. Elle couvre le domaine de 400 nmol.L^{-1} à $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$, soit 5 fois celui obtenu avec une forte concentration d'hexamine. Ce constat nous a amenés à conclure à l'existence de complexes hybrides $\text{Tb}(\text{Hexamine})_4(\text{H}_2\text{O})$ et $\text{Tb}(\text{Hexamine})_4(\text{AN})$ avec une complexation de type monodentate pour l'acide nicotinique. Afin d'apporter d'autres arguments pour étayer ou écarter cette hypothèse, nous avons également entrepris de mesurer le temps de vie des divers complexes en solution en fonction de la concentration des réactifs.

III.2.3 Mesures des durées de vie des complexes de Tb^{3+}

Les intensités de luminescence obtenues avec la lampe de Xe pulsée ne sont pas suffisamment intenses pour une bonne détermination des durées de vie. Pour cette mesure, nous avons utilisé comme source d'excitation un laser Nd-YAG impulsionnel (10 ns), quadruplé en fréquence. L'énergie d'excitation à 266 nm, qui peut être variée entre 1 mJ à 20 mJ, va permettre d'exciter l'échantillon de façon homogène sur un parcours optique de 1 cm. La luminescence de Tb^{3+} est collectée à 544 nm à l'aide d'un monochromateur et d'un photomultiplicateur. L'appareillage est décrit de façon plus détaillée dans le chapitre II.

La durée de vie de luminescence de Tb^{3+} a été mesurée en milieu désaéré et aéré et dans divers milieux :

- solution aqueuse non tamponnée
- solutions aqueuses tamponnées à l'hexamine à différentes concentrations : $0,01$ et $0,14 \text{ mol.L}^{-1}$

- solution aqueuse tamponnée à l'hexamine 0,01 mol.L⁻¹ avec différentes concentrations d'acide nicotinique
- solution aqueuse tamponnée à l'hexamine 0,14 mol.L⁻¹ avec différentes concentrations d'acide nicotinique

Les résultats obtenus sont montrés dans les Figure 43 et rassemblés dans le Tableau 12 à titre comparatif. Les cinétiques de déclin ont été ajustées avec une exponentielle décroissante. La durée de vie de Tb³⁺ excité ne semble pas dépendre de la concentration d'hexamine, la valeur moyenne étant égale à 390±30 μs. En revanche, l'intensité de luminescence augmente rapidement et atteint une valeur plateau pour une concentration d'hexamine égale à 10⁻² mol.L⁻¹.

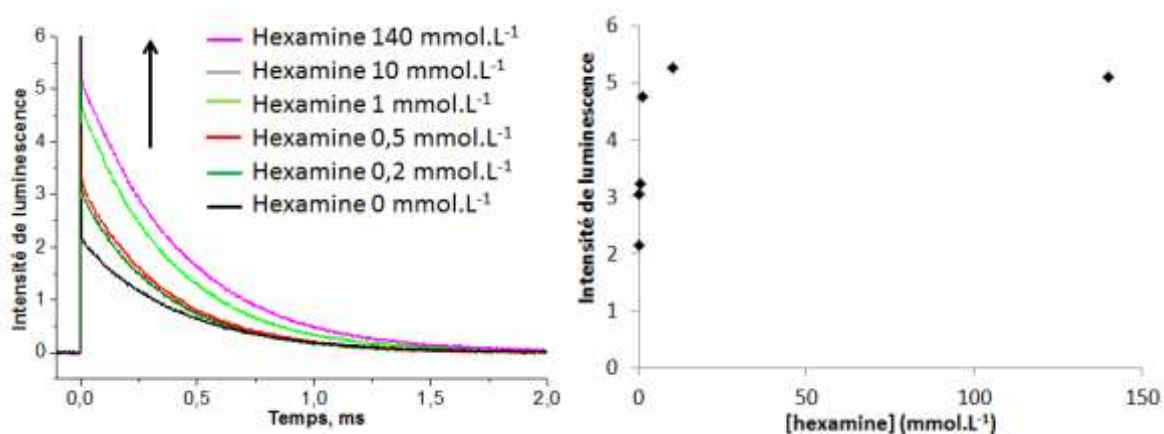


Figure 43. Déclins de luminescence (gauche) et variation de l'intensité de luminescence (droite) de Tb³⁺ (200 μmol.L⁻¹) en solutions aqueuses à différentes concentrations d'hexamine. pH = 6,4. λ_{exc} = 266 nm avec un laser Nd : YAG quadruplé en fréquence.

Tableau 12. Durée de vie des espèces présentes lors de l'excitation de solutions aqueuses de Tb(NO₃)₃ désaérées ou aérées, en absence et en présence d'hexamine

[Tb ³⁺] μmol.L ⁻¹	[Hexamine] μmol.L ⁻¹	[AN] μmol.L ⁻¹	Ar/Air	Energie laser mj	Monoexponentiel		R ²
					A ₁	τ ₁	
200	0	0	Air	1	2,2	413	0,9998
200	2 10 ⁻³	0	Air	1	3,0	353	0,9995
200	5 10 ⁻³	0	Air	1	3,2	360	0,9995
200	10 ⁻³	0	Air	1	4,7	382	0,9998
200	10 ⁻²	0	Air	1	5,3	423	0,9998
200	1,4 10 ⁻¹	0	Air	1	5,1	403	0,9998

Ce résultat diffère légèrement de celui obtenu précédemment (comparer figures 28 et 43). En effet, la courbe d'évolution de l'intensité de luminescence en fonction de la concentration d'hexamine lors de l'excitation avec la lampe au xénon pulsée montrait une augmentation progressive de la luminescence entre 0,01 et 0,71 mol.L⁻¹ d'hexamine. Bien que le rapport d'intensité de luminescence reste le même entre la solution la plus concentrée (Hexamine = 0,14 mol.L⁻¹) et celle qui ne contient pas d'hexamine, l'augmentation de l'intensité est bien plus grande lorsque la source d'excitation est le laser impulsif qu'avec la lampe pulsée. Cette différence pourrait provenir du

fait que Tb^{3+} est directement excité avec une meilleure efficacité avec le laser à 266 nm à une longueur d'onde où la contribution de l'hexamine comme absorbant est moindre.

L'ajout d'acide nicotinique à la solution aqueuse la plus concentrée en hexamine ($0,14 \text{ mol.L}^{-1}$) induit une augmentation significative de l'intensité de luminescence (Figure 44) sans toutefois changer la durée de vie de Tb^{3+} excité. Cette dernière déduite des déclin monoexponentiels est égal à $380 \pm 20 \mu\text{s}$.

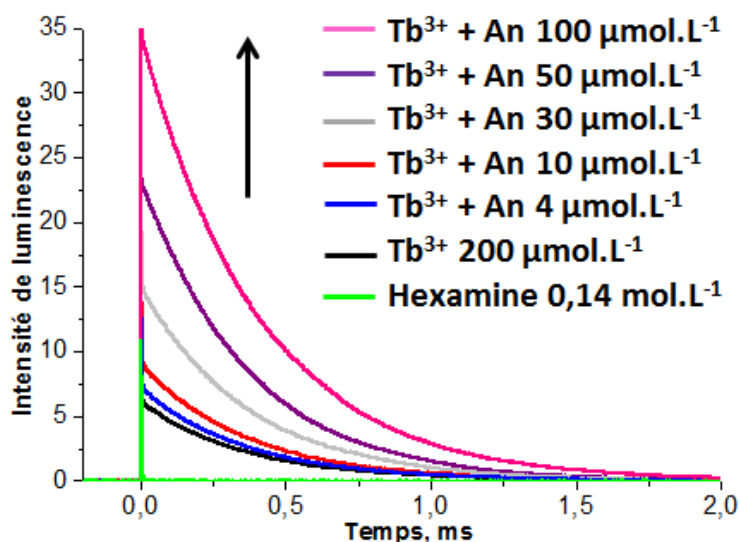


Figure 44. Déclin de luminescence de $Tb^{3+} 200 \mu\text{mol.L}^{-1}$ dans les solutions aqueuses tamponnées à l'hexamine $0,14 \text{ mol.L}^{-1}$ pour différentes concentrations d'acide nicotinique.

Dans la gamme de concentration d'acide nicotinique explorée, l'intensité de luminescence augmente linéairement avec la concentration d'acide nicotinique. Ce résultat corrobore l'effet d'antenne de l'acide nicotinique décrit précédemment et montre que la gamme de linéarité pour la détection de l'acide nicotinique peut être plus étendue avec une source d'excitation adéquate (comparer Figure 36 et Figure 45).

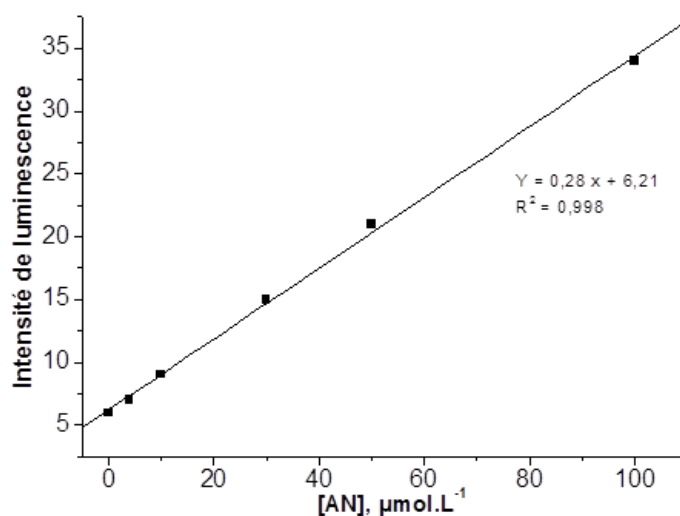


Figure 45. Variation de l'intensité de luminescence de $Tb^{3+} 200 \mu\text{mol.L}^{-1}$ en fonction de la concentration d'acide nicotinique dans les solutions aqueuses contenant $0,14 \text{ mol.L}^{-1}$ d'hexamine

Cette expérience a été répétée pour des solutions contenant une plus faible concentration d'hexamine ($0,01 \text{ mol.L}^{-1}$).

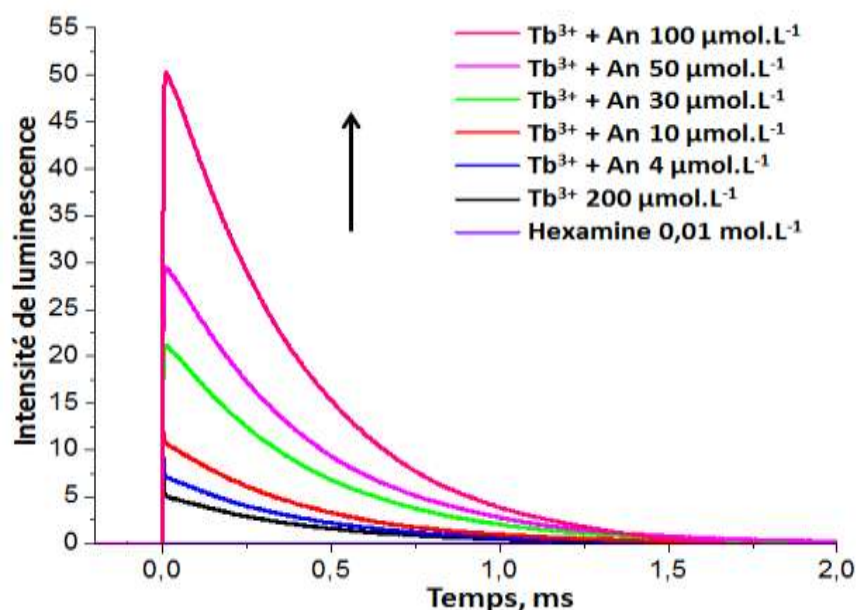


Figure 46. Déclins de luminescence de Tb^{3+} $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$ dans les solutions aqueuses tamponnées à l'hexamine $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$ pour différentes concentrations d'acide nicotinique. pH = 6,4.

On observe également dans ce cas une augmentation significative de l'intensité de luminescence de Tb^{3+} avec une variation linéaire en fonction de la concentration d'acide nicotinique dans tout le domaine de concentration exploré.

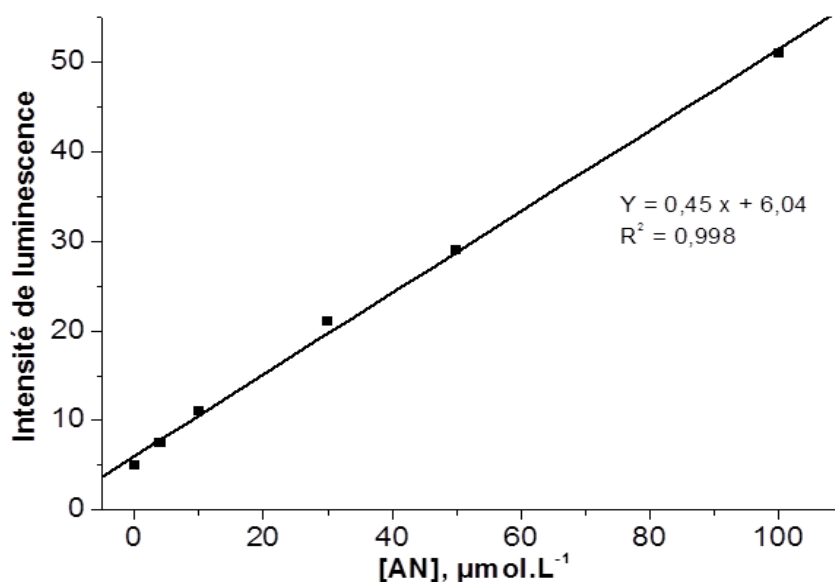


Figure 47. Variation de l'intensité de luminescence de Tb^{3+} $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$ en fonction de la concentration d'acide nicotinique dans les solutions aqueuses contenant $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$ d'hexamine. pH = 6,4.

On peut noter une augmentation de luminescence plus importante avec une concentration plus faible d'hexamine de $0,01$ au lieu de $0,14 \text{ mol.L}^{-1}$ (comparer Figure 39 et Figure 47). Ce résultat est en accord avec ce qui a été observé antérieurement (voir Figure 28) et corrobore l'hypothèse d'une compétition, en tant que chélatants, entre les molécules d'hexamine et d'acide nicotinique. Le

nombre de sites de coordination disponibles pour l'acide nicotinique diminue lorsque la concentration d'hexamine augmente. Le deuxième constat est que l'effet d'antenne est beaucoup plus efficace avec l'acide nicotinique qu'avec l'hexamine.

Les états triplets des composés organiques sont très sensibles au dioxygène, qui se trouve dans un état triplet, à l'état fondamental. En présence d'O₂, une compétition peut avoir lieu entre le transfert d'énergie du ligand vers le cation lanthanide ou vers O₂. Pour vérifier cette hypothèse, une solution a été désaérée par barbotage de l'argon pendant 30 min, puis réoxygénée par barbotage avec de l'oxygène.

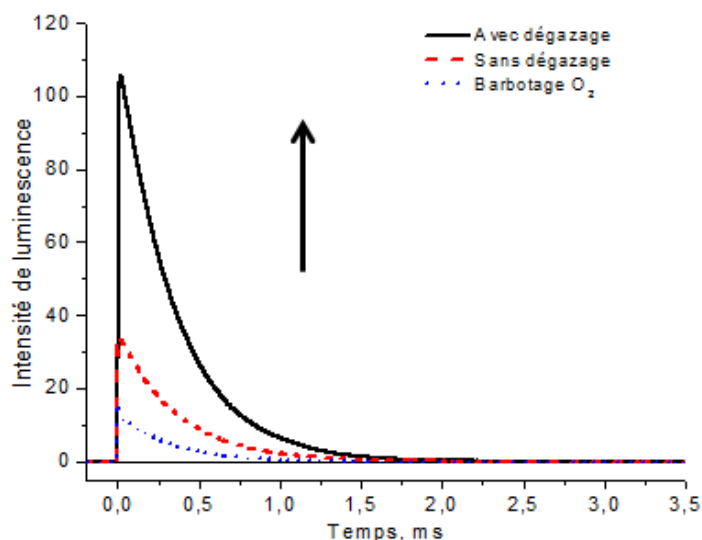


Figure 48. Effet de la présence d'O₂ dans une solution contenant de l'hexamine à 0,01 mol.L⁻¹, 200 μmol.L⁻¹ de Tb(NO₃)₃ et 50 μmol.L⁻¹ d'acide nicotinique

On observe un effet très net de désactivation des états triplets de l'acide nicotinique et d'hexamine par O₂, avec la baisse importante de l'intensité de luminescence de Tb³⁺ dans la solution désaérée. Celle-ci chute d'une valeur de 110 à 18 lorsque la solution est saturée d'oxygène. Ce résultat montre que l'optimisation du rendement de luminescence de Tb³⁺ devra impliquer une désaération du milieu d'analyse. Un autre résultat remarquable est que la durée de vie de luminescence de Tb³⁺ reste inchangée en présence d'oxygène. Ainsi, l'oxygène n'interfère que dans le processus de transfert d'énergie entre l'état triplet d'AN excité et Tb³⁺, en diminuant le rendement de ce transfert.

III.2.4 Comparaison avec les données de la littérature

De nombreuses études de la complexation des sels de terbium avec un grand nombre de ligands organiques existent dans la littérature. Des effets d'antenne plus ou moins importants ont été trouvés selon la nature du ligand, le pH du milieu, la présence de tampons et de surfactants neutres ou ioniques. De même, pour les sels de terbium, les durées de vie de luminescence peuvent varier entre 100 μs et 3,5 ms. La synthèse d'un grand nombre de travaux a été réalisée par Arnaud et Georges [16], qui résume les points les plus importants. Deux paramètres gouverneraient la durée de vie de luminescence de Tb³⁺ :

1. La durée de vie de luminescence de Tb³⁺ dépendrait fortement du nombre de molécules d'eau présentes dans la première sphère de coordination de l'ion lanthanide. Horrocks et al. [17] l'ont montré par des mesures de durées de vie de luminescence de sels cristallins à

divers niveaux d'hydratation. Ce phénomène a été attribué au couplage vibronique entre l'ion Tb^{3+} excité et les oscillateurs OH des molécules d'eau très proches. La durée de vie de sels de Tb^{3+} diminuerait progressivement de 3,33 ms à 400 μs avec le nombre de molécules d'eau variant entre 0 et 9. La durée de vie mesurée serait reliée au nombre de molécules d'eau coordonnées par la relation :

$$\tau_{obs}^{-1} = \tau_{nat}^{-1} + \tau_{nr}^{-1} + \frac{n}{9} \tau_{OH}^{-1}$$

Où τ_{nat}^{-1} est la constante de vitesse de déclin intrinsèque de luminescence ($\sim 0,11 \text{ ms}^{-1}$), τ_{nr}^{-1} , la constante de vitesse de déclin non radiative n'impliquant pas les molécules d'eau ($\sim 0,19 \text{ ms}^{-1}$), τ_{OH}^{-1} la constante de vitesse de transfert d'énergie par couplage vibronique avec les molécules d'eau et n est le nombre de molécules d'eau coordonnées ($\sim 2,15 \text{ ms}^{-1}$).

- La durée de vie de luminescence de Tb^{3+} pourrait aussi dépendre de l'énergie de l'état triplet du ligand : Si celle-ci se trouve entre les niveaux 5D_3 (26250 cm^{-1}) et 5D_4 (20500 cm^{-1}) en étant proche de celle du niveau de Tb^{3+} , un transfert-retour de l'énergie d'excitation est possible, augmentant ainsi la valeur de la constante de désactivation par voie non radiative. Dans ce cas, plus l'énergie du triplet du ligand sera proche de celle du niveau 5D_4 de Tb^{3+} , et plus la durée de vie de luminescence de Tb^{3+} serait courte. La figure suivante montre la relation entre la durée de vie de luminescence mesurée et l'énergie de l'état triplet pour divers ligands, lorsque leur valeur est connue.

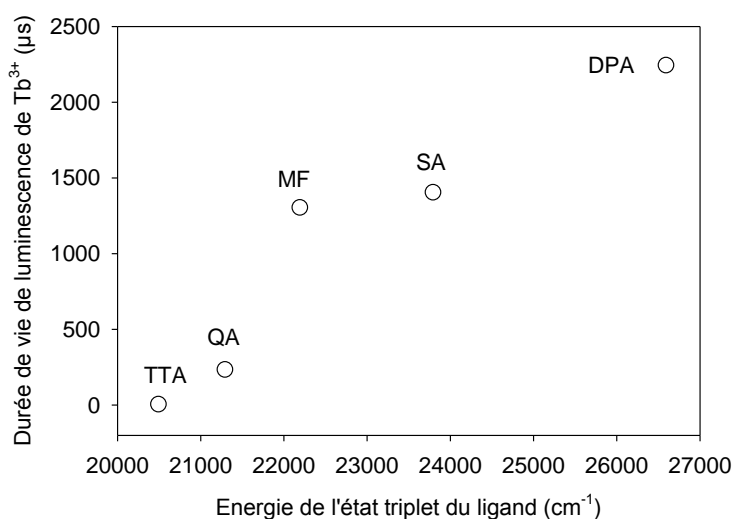


Figure 49. Variation de la durée de vie de luminescence de Tb^{3+} en fonction de l'énergie de l'état triplet du ligand organique. DPA = pyridine-2,6-dicarboxylic acid, SA = salicylic acid, MF = mefenamic acid, OA = orotic acid, TTA = thenoyltrifluoroacetone. Valeurs extraites de la référence [16].

Nous avons trouvé une durée de vie de luminescence de $Tb(NO_3)_3$ en solution aqueuse tamponnée à l'hexamine de 400 μs . Cette valeur est semblable à celle trouvée par Bunzli et al. [18] et Cable et al. [19], qui l'ont attribuée à $Tb(H_2O)_9^{3+}$ sur la base des résultats d'Horrocks [17]. Dans notre cas, nous avons attribué ce temps de vie non seulement à l'espèce $Tb(NO_3)_3(H_2O)_3$, mais également aux espèces $Tb(NO_3)_x(\text{Hexamine})_y(H_2O)_{9-x-y}$ et $Tb(NO_3)_x(\text{AN})_y(\text{Hexamine})_{9-x-y}$. Cette attribution, qui semble curieuse au premier abord, pourrait trouver une première explication sur la base de la courbe de variation de la durée de vie de luminescence de Tb^{3+} en fonction de l'énergie de l'état triplet du ligand. Avec l'hypothèse d'un état triplet de l'hexamine dont l'énergie serait proche de celle de l'état

5D_4 de Tb^{3+} , une réaction de transfert-retour de l'énergie d'excitation pourrait alors être envisagée et induirait un canal supplémentaire de désactivation non radiative pour Tb^{3+} . La méconnaissance des propriétés des états excités de l'hexamine en milieu aqueux ne permet cependant pas de confirmer cette hypothèse.

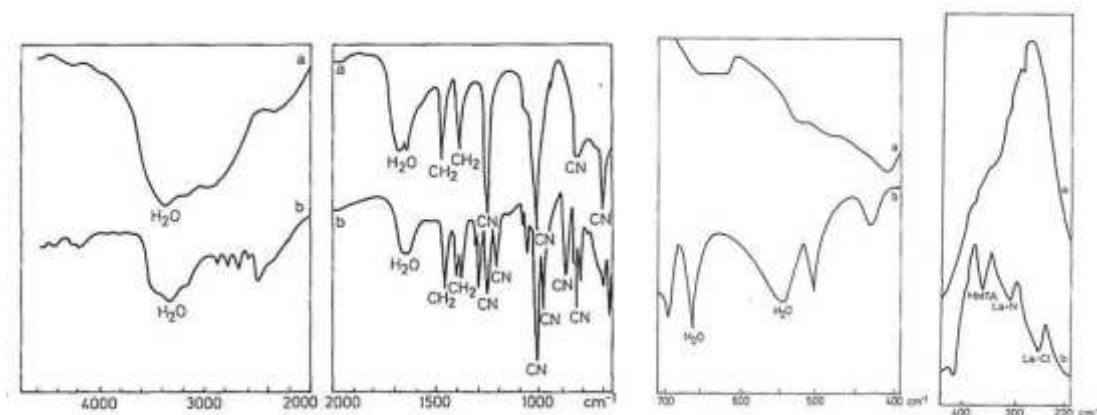


Figure 50. Spectres IR des complexes (a) : $La(Hexamine)_2(H_2O)_{12}$ et (b) $La(Hexamine)_2(H_2O)_8$ extraits de [17]

La deuxième hypothèse proposée pour expliquer nos résultats repose sur les spectres IR de l'hexamine. Dans le domaine IR entre 4000 et 700 cm^{-1} , Zalewicz [20] a montré avec les complexes de lanthane, $LaCl_3(Hexamine)_2(H_2O)_{12}$ et $LaCl_3(Hexamine)_2(H_2O)_8$, que les vibrations de valence et d'élongation des liaisons OH de l'eau sont fortement diminuées au profit de celles de CN qui sont fortement exaltées, lorsque le nombre de molécules d'eau diminue de 12 à 8. Ainsi, le couplage vibronique de Tb^{3+} excité avec les CN de l'hexamine pourrait venir remplacer celui existant avec les OH de l'eau, induisant une autre voie de perte de l'énergie d'excitation par voie non radiative. Cette hypothèse nous permet d'expliquer à la fois le gain d'intensité de luminescence dû à la présence d'acide nicotinique et d'hexamine, agissant comme des antennes, et la durée de vie quasiment « invariable » de $390 \pm 30\ \mu s$ de Tb^{3+} . Cette hypothèse sera justifiée par la suite avec l'étude des propriétés des complexes de Tb^{3+} dans les matrices solides.

Concernant l'effet d'antenne, c'est la capacité du ligand à chélater l'ion Tb^{3+} , qui favoriserait l'effet d'antenne. Selon Arnaud et Georges [15], cette capacité est grande lorsque le ligand contient un noyau aromatique et des atomes d'oxygène ou/et d'azote. Le pH et la présence de tampon ou de surfactant ionique jouent alors un rôle important, notamment en déplaçant les équilibres chimiques pour favoriser les formes ioniques des acides carboxylés ou phénoliques. Nos observations sur les effets de pH sur la complexation de l'acide nicotinique corroborent les résultats antérieurs de la littérature.

Dans cette étude, nous avons étudié les paramètres influençant la formation et la luminescence du complexe Tb^{3+}/AN . L'étude suivante a pour but d'étudier l'influence des autres marqueurs de la tuberculose sur la luminescence du complexe.

IV. Etude des interférences

Syhre et al. ont isolé quatre marqueurs de la tuberculose détectables dans l'haleine de patients atteints par la tuberculose : le nicotinate de méthyle (NM), le para-anisate de méthyle (pAM), le phénylacétate de méthyle (PM) et l'o-phénylanisole (2-méthoxy biphenyle) (MB) [21]. Ces composés peuvent être présents dans l'haleine en même temps que l'acide nicotinique. Ces

composés peuvent donc potentiellement interférer avec la détection de l'acide nicotinique. Nous avons étudié les caractéristiques spectroscopiques de ces composés pour connaître leur capacité d'interférence et la nature de l'interférence générée. En particulier, nous tenterons d'élucider si ces marqueurs peuvent complexer Tb^{3+} en induisant comme l'acide nicotinique un effet antenne ou intervenir de manière destructive en absorbant de manière compétitive l'énergie d'excitation avec pour conséquence une diminution de la luminescence de Tb^{3+} .

IV.1 Etude spectrophotométrique des marqueurs

Les propriétés optiques des composés ont été collectées et sont présentées dans le Tableau 13 et la Figure 51.

Tableau 13. Coefficient d'extinction molaire de la molécule-sonde et des marqueurs. Tampon hexamine 0,14 mol.L⁻¹ pH 6,4.

Composé	Tb ³⁺	AN	NM	pAM	MB	PM
$\epsilon_{260\text{ nm}}$ (M ⁻¹ .cm ⁻¹)	4 ± 2	2970 ± 145	2720 ± 140	15600 ± 200	3500 ± 200	150 ± 10

Nous pouvons voir que trois sur quatre des métabolites absorbent dans la même zone que l'acide nicotinique avec des valeurs égales ou bien plus élevées du coefficient d'extinction molaire à 260 nm. C'est le cas de NM, MB et de pAM. Une première interférence de ces composés pour l'acide nicotinique pourra donc être une compétition pour la collecte des photons.

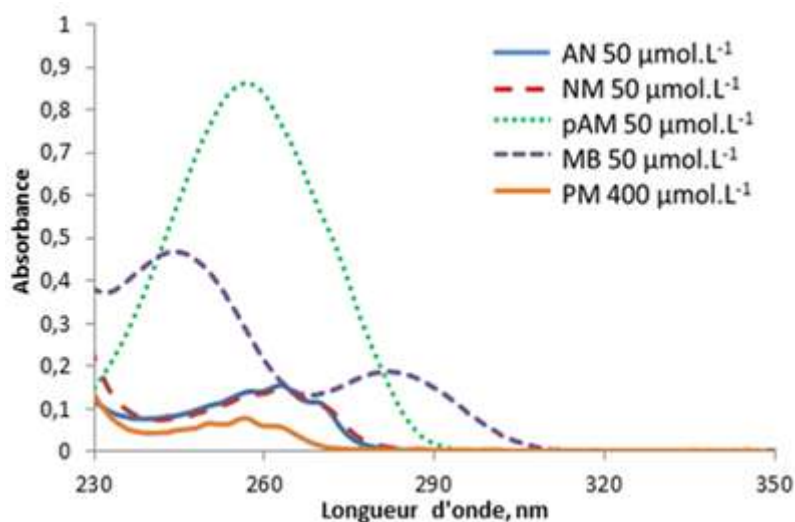


Figure 51. Spectres d'absorption des différents marqueurs. Tampon hexamine 0,14 mol.L⁻¹ pH 6,4.

IV.2 Intensité de luminescence du nitrate de terbium en présence de chaque métabolite

Para-anisate de méthyle

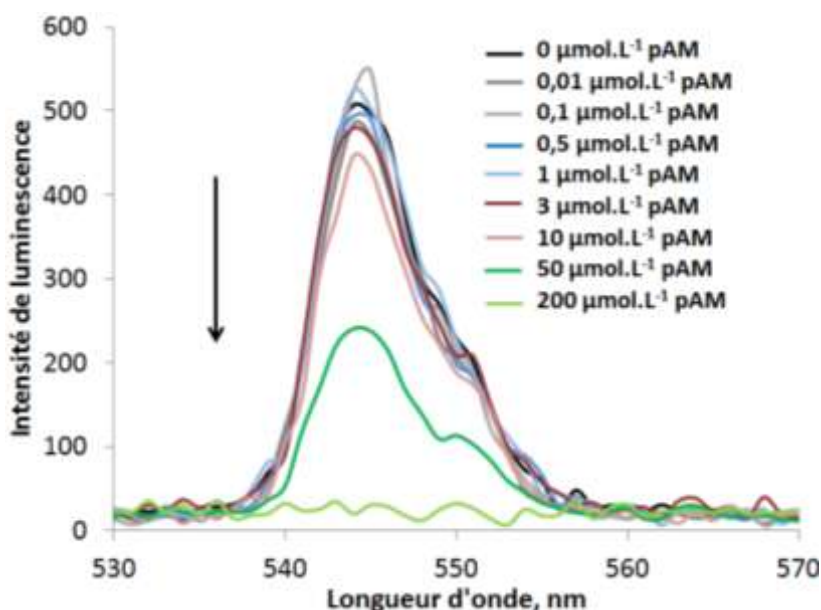


Figure 52. Spectres de luminescence du complexe $Tb(NO_3)_3$ -AN en fonction de la concentration en para-anisate de méthyle (pAM). Tb^{3+} : $200 \mu mol.L^{-1}$, AN : $3 \mu mol.L^{-1}$, pAM : $0,01$ - $200 \mu mol.L^{-1}$.

Des concentrations croissantes de chaque métabolite ont été mélangées à $200 \mu mol.L^{-1}$ de Tb^{3+} , en présence ou non d'acide nicotinique. Nous avons choisi de travailler avec une concentration d'acide nicotinique de $3 \mu mol.L^{-1}$, de manière à être suffisamment éloigné de la limite de détection de la méthode. Les premières figures présentent les résultats de l'étude menée avec le para anisate de méthyle. Par la suite, seules les figures présentant la répartition de la surface des pics en fonction de la concentration de marqueurs sont présentées.

Une diminution de la luminescence de Tb^{3+} est observée lorsque la concentration de pAM augmente. Cette diminution suit une loi de décroissance exponentielle de la forme $y = y_0 + A \exp(-t[pAM])$. La vitesse de déclin de luminescence de Tb^{3+} en présence de pAM est de $22,2 \mu mol^{-1}.L$. L'ajout d'acide nicotinique même en faible concentration ($3 \mu mol.L^{-1}$) induit une augmentation de la luminescence de Tb^{3+} mais celle-ci diminue avec l'augmentation de la concentration de pAM avec une vitesse de déclin de $51,3 \mu mol^{-1}$.

En l'absence d'acide nicotinique, la diminution de luminescence de Tb^{3+} en présence de pAM indique qu'il n'y a pas de transfert d'énergie de pAM vers Tb^{3+} . Ce fait semble indiquer l'absence de complexation entre Tb^{3+} et pAM. En présence d'acide nicotinique, la diminution de la luminescence de Tb^{3+} lorsque la concentration de pAM augmente indique une compétition entre l'acide nicotinique et pAM pour la collecte des photons d'excitation. Le coefficient d'extinction molaire de pAM étant 5,2 fois plus élevé que celui de l'acide nicotinique, l'interférence de pAM intervient dès la concentration de $0,6 \mu mol.L^{-1}$ pour une concentration d'AN de $3 \mu mol.L^{-1}$.

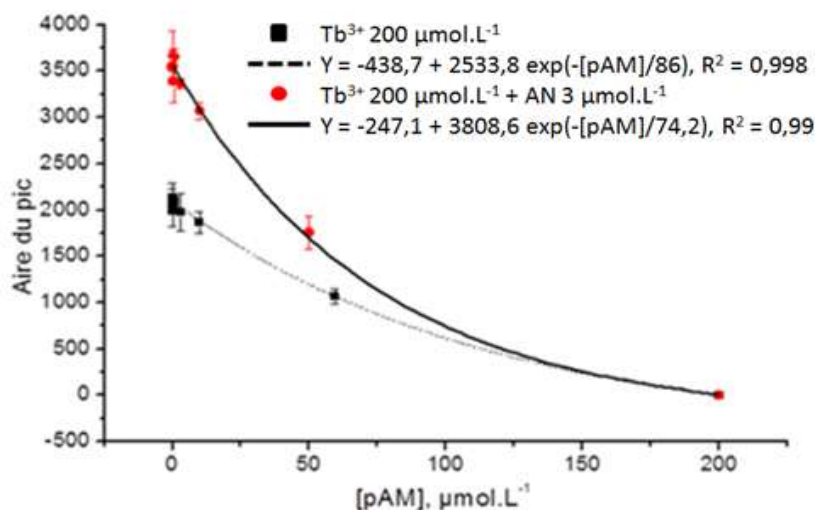


Figure 53. Influence de la concentration en para anisate de méthyle (pAM) sur la luminescence du nitrate de terbium $Tb(NO_3)_3$ et du complexe $Tb(NO_3)_3$ -AN. Tb^{3+} : $200 \mu mol.L^{-1}$, AN : $3 \mu mol.L^{-1}$, pAM : $0,01$ - $200 \mu mol.L^{-1}$

Phénylacétate de méthyle

En l'absence d'acide nicotinique, une diminution de la luminescence de Tb^{3+} est observée lorsque la concentration de PM augmente. Cette diminution est très faible et correspond à une vitesse de déclin de $3,5 \mu mol^{-1}.L$ de PM. L'ajout de $3 \mu mol.L^{-1}$ d'acide nicotinique induit une augmentation de la luminescence de Tb^{3+} , mais cette augmentation diminue avec des teneurs croissantes de MB. La vitesse de déclin de la luminescence est dans ce cas de $4,4 \mu mol^{-1}.L$ de PM. L'interférence observée est de même nature que celle induite par pAM. Son intensité est moindre parce que PM a un coefficient d'extinction molaire 20 fois plus faible que celui de l'acide nicotinique.

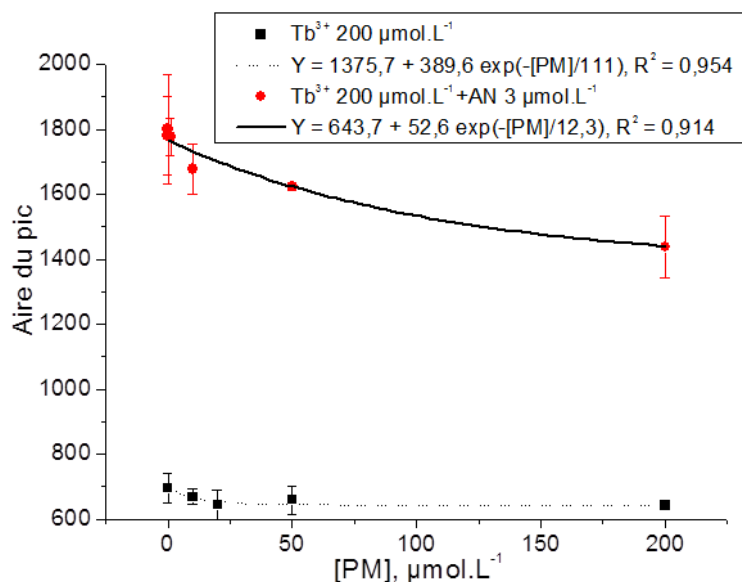


Figure 54. Influence de la concentration en phénylacétate de méthyle (PM) sur la luminescence du nitrate de terbium $Tb(NO_3)_3$ et du complexe $Tb(NO_3)_3$ -AN. Tb^{3+} : $200 \mu mol.L^{-1}$, AN : $3 \mu mol.L^{-1}$, MP : $0,01$ - $200 \mu mol.L^{-1}$

2-méthoxy biphenyle

Une diminution de la luminescence de Tb^{3+} est observée lorsque la concentration de MB augmente, en absence comme en présence d'acide nicotinique. Les vitesses de déclin de

luminescence de Tb^{3+} sont respectivement de 3,7 et de 10 $\mu\text{mol}^{-1}\cdot\text{L}$ de MB. La diminution de luminescence observée peut être expliquée de la même manière qu'en présence du p-anisate de méthyle ; il s'agit d'une absorption compétitive du rayonnement d'excitation à 260 nm par le méthoxy biphényle dont le coefficient d'extinction molaire est 1,17 fois plus élevé que celui de l'acide nicotinique. Il n'y a pas complexation de MB avec Tb^{3+} .

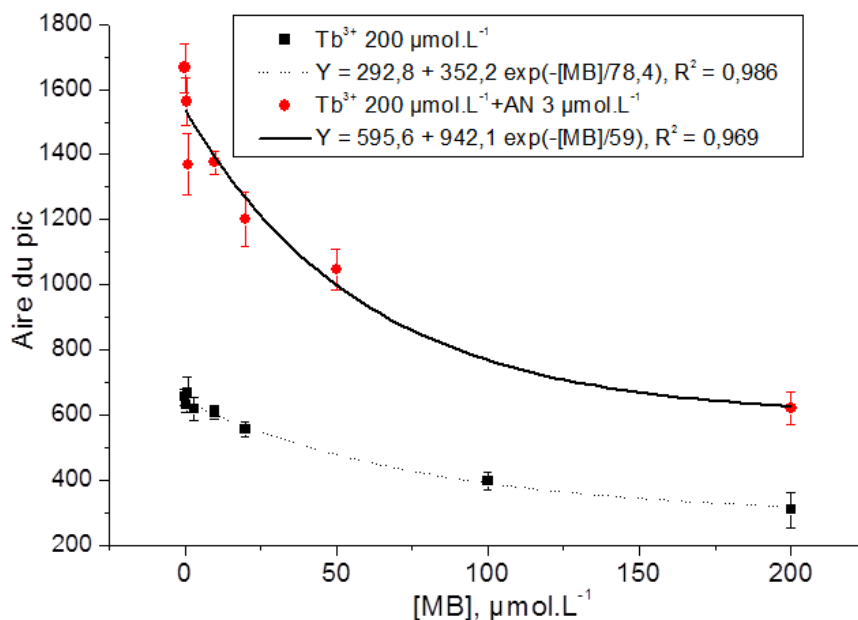


Figure 55. Influence de la concentration en 2-méthoxy biphényle (MB) sur la luminescence de $Tb(\text{NO}_3)_3$ en absence et en présence d'acide nicotinique. Tb^{3+} : 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, AN : 3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, MB : 0,01-200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

Nicotinate de méthyle

L'ajout de concentrations croissantes de nicotinate de méthyle entraîne une diminution de la luminescence de Tb^{3+} à une vitesse de 2,7 $\mu\text{mol}^{-1}\cdot\text{L}$ de NM. Cette diminution est encore plus rapide en présence d'acide nicotinique 3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, avec une vitesse de 22 $\mu\text{mol}^{-1}\cdot\text{L}$ de NM.

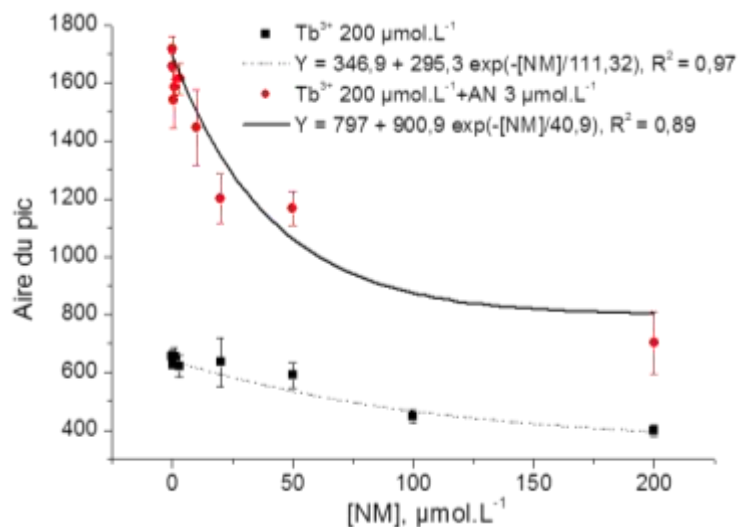


Figure 56. Influence de la concentration en nicotinate de méthyle (NM) sur la luminescence de $Tb(\text{NO}_3)_3$ en absence et en présence d'acide nicotinique. Tb^{3+} : 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, AN : 3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, NM : 0,01-200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

L'absence d'augmentation de la luminescence de Tb^{3+} en présence de NM amène à penser que NM ne complexe pas l'ion terbium (III). La diminution de luminescence observée peut être expliquée de la même manière qu'en présence du p-anisate de méthyle, il s'agit d'une absorption compétitive du rayonnement d'excitation à 260 nm par le nicotinate de méthyle.

Le Tableau 14 résume les effets observés pour les 4 marqueurs. On voit que le déclin de luminescence est lié à la capacité des marqueurs à absorber les photons à 260 nm et à dissiper l'énergie d'excitation par d'autres voies excluant le transfert d'énergie au Tb^{3+} .

Tableau 14. Influence des autres marqueurs sur la luminescence du nitrate de terbium

interfèrent	$\epsilon(260\text{ nm}) (\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1})$	$V_{\text{déclin}} (Tb^{3+}) (\mu\text{mol}^{-1}.\text{L})$	$V_{\text{déclin}} (Tb^{3+}\text{-AN}) (\mu\text{mol}^{-1}.\text{L})$
pAM	15600±800	- 22,0±0,16	- 51,3±0,3
MB	3500±200	- 4,5±0,8	- 16,0±0,3
NM	2700±140	- 2,7±0,8	- 22,0±0,4
PM	150±20	- 3,5±1,4	- 4,4±2,4

La Figure 57 montre le pourcentage de diminution de luminescence de Tb^{3+} en fonction du pourcentage d'augmentation de l'absorbance à la longueur d'onde d'excitation pour chaque marqueur, en absence et en présence d'acide nicotinique. La comparaison de ces courbes montre qu'en absence d'acide nicotinique, la diminution de luminescence n'est significative qu'au-delà d'une augmentation d'absorbance de ~80% due à la présence du marqueur. Cette diminution est en revanche plus importante en présence d'acide nicotinique. Elle devient significative dès que l'absorbance de l'interfèrent est égale à la moitié de celle de l'acide nicotinique.

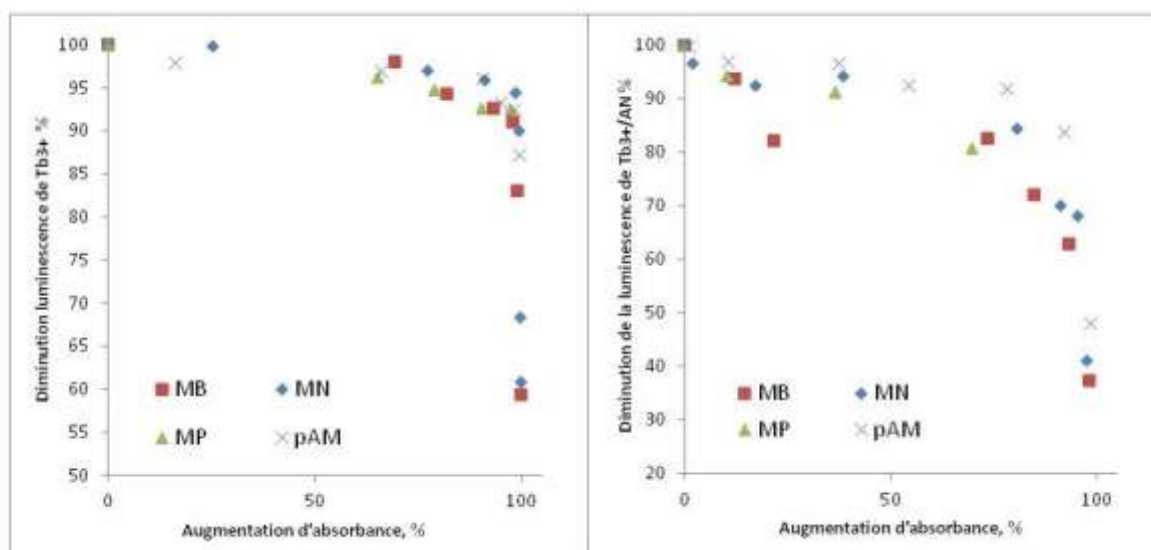


Figure 57. Comparaison de l'effet d'absorption des photons d'excitation par les marqueurs sur la luminescence de Tb^{3+} en absence et en présence d'acide nicotinique $3\ \mu\text{mol}.\text{L}^{-1}$.

Cette étude a permis de montrer que :

- Les quatre marqueurs, pAM, MB, MN et PM ne complexent pas Tb^{3+} , aucune augmentation de la luminescence de Tb^{3+} n'ayant été observée en présence de ces composés.
- Ces composés induisent une diminution de la luminescence de Tb^{3+} en absence et en présence d'acide nicotinique du fait qu'ils absorbent également à 260 nm. Il s'agit d'une

absorption compétitive du rayonnement incident à 260 nm au profit de l'espèce la plus absorbante.

Les résultats de cette étude indiquent que la détection sélective de l'acide nicotinique en présence de ces composés n'est pas possible en milieu aqueux et illustrent un cas d'interférence destructive. Nous avons par la suite étudié un cas d'interférence « constructive » afin de savoir si l'effet de l'acide nicotinique peut être différencié de l'effet de cet interférent.

IV.3 L'acide benzoïque : un analyte et interférent potentiel

L'acide benzoïque est utilisé comme conservateur dans l'alimentation, sous la dénomination E210. On le retrouve également sous la forme de sels de benzoate, E11, E112 et E113 respectivement pour les sels de sodium, de potassium et de calcium. Les concentrations autorisées en Europe dans les boissons sont de 150-200 mg.L⁻¹ soit 1,23-1,64 mmol.L⁻¹, et de 2g/kg pour les aliments.

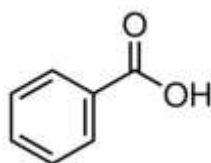


Figure 58. Représentation schématique de l'acide benzoïque

L'acide benzoïque a une structure proche de celle de l'acide nicotinique : il possède un cycle aromatique et une fonction acide carboxylique. Il se différencie de l'acide nicotinique par son cycle aromatique, qui est un cycle benzénique alors que l'acide nicotinique est constitué d'un cycle pyridinique. Contrairement au ligand bidentate qu'est l'acide nicotinique, la complexation des molécules d'acide benzoïque, via sa fonction acide carboxylique, devrait ressembler plus à celle de l'acide acétique. La présence d'un groupement phényle conférant à l'acide benzoïque une absorption plus importante que l'acide acétique, l'effet antenne devrait être favorisé dans ce cas.

IV.3.1 Caractéristiques spectrophotométriques de l'acide benzoïque

La Figure 59 présente les spectres d'absorption de l'acide benzoïque à différentes concentrations dans des solutions aqueuses tamponnées d'hexamine 0,14 mol.L⁻¹.

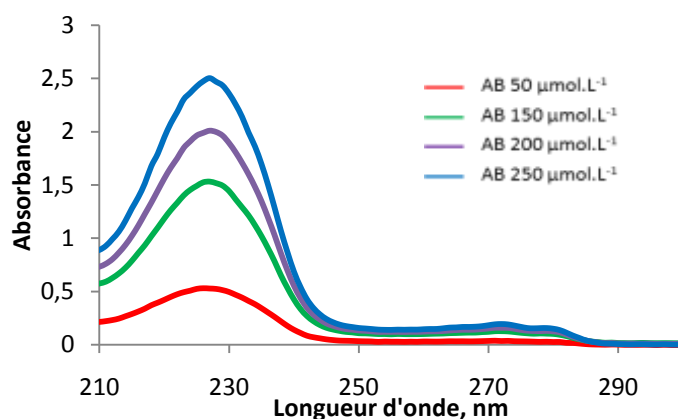


Figure 59. Spectre d'absorption de l'acide benzoïque à différentes concentrations dans une solution aqueuse tamponnée à l'hexamine 0,14 mol.L⁻¹, pH = 6,4.

L'acide benzoïque présente une bande d'absorption principale avec un maximum centré à 227 nm. Le coefficient d'extinction molaire correspondant est de 10100 ± 300 L.mol⁻¹.cm⁻¹. La valeur

du coefficient d'extinction molaire à 260 nm est de $630 \pm 50 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$, soit environ 5 fois plus faible que pour l'acide nicotinique.

IV.3.2 Luminescence du nitrate de terbium et de son complexe avec l'acide nicotinique en présence d'acide benzoïque

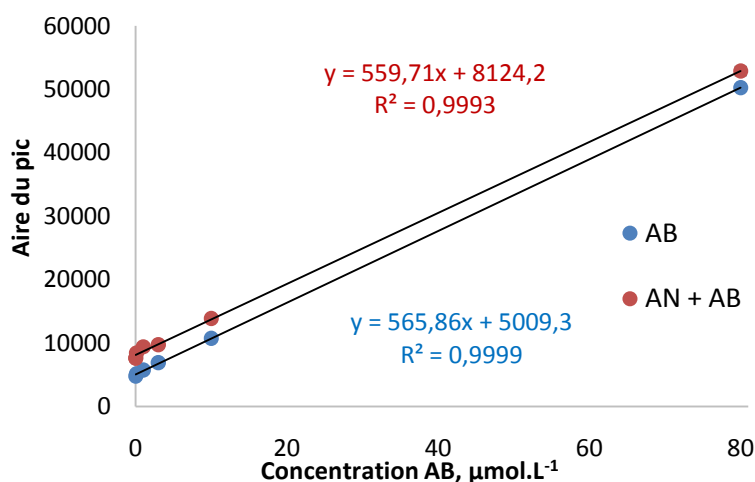


Figure 60. Influence de la concentration d'acide benzoïque sur la luminescence de Tb^{3+} en absence et en présence d'acide nicotinique. Tb^{3+} : $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$, AN : $3 \mu\text{mol.L}^{-1}$, AB : $0,01\text{-}80 \mu\text{mol.L}^{-1}$

L'ajout d'acide benzoïque jusqu'à une concentration de $80 \mu\text{mol.L}^{-1}$ induit une augmentation linéaire de l'intensité de luminescence de la molécule-sonde. Ce composé est donc capable de remplacer les ions NO_3^- et de complexer le terbium en induisant un effet antenne. L'efficacité de la complexation peut être mesurée par la pente de la droite : elle est de $566 \mu\text{mol}^{-1}.\text{L}$.

On remarque qu'en présence d'une concentration fixe de $3 \mu\text{mol.L}^{-1}$ d'acide nicotinique, une augmentation constante de l'intensité de luminescence est apportée par la présence de ce dernier. Aux concentrations d'acide benzoïque et d'acide nicotinique utilisées, les deux ligands ne sont pas en compétition et remplacent tous deux les ions NO_3^- . L'intensité de luminescence est proportionnelle au nombre de photons absorbés par chacun des ligands jouant le rôle d'antenne, l'absorbance totale des deux ligands étant au maximum égale à 0,059 dans la gamme de concentration explorée. Il n'apparaît donc pas possible de différencier les effets respectifs de l'acide nicotinique et de l'acide benzoïque. La détection de l'acide nicotinique ou de l'acide benzoïque apparaît compliquée dans des milieux aqueux contenant ces deux constituants.

Les études entreprises pour explorer les interférences potentielles de diverses molécules-marqueur de la TB et de l'acide benzoïque sur la complexation en solution de l'acide nicotinique avec Tb^{3+} ont permis de mettre en exergue les difficultés liées aux interférences destructives (diminution de la luminescence) et constructives (augmentation de la luminescence). Les milieux étudiés, bien que simples, comportent i) une molécule-tampon, l'hexamine, capable de complexer Tb^{3+} et de diminuer les processus de désactivation de l'état excité de Tb^{3+} par les molécules d'eau, ii) un ligand bidentate ou monodentate, l'acide nicotinique capable de se ligander très rapidement à Tb^{3+} et de jouer le rôle d'antenne, et iii) des molécules interférentes qui ne forment pas de complexe avec Tb^{3+} , mais qui absorbent partiellement les photons au détriment de l'acide nicotinique et iv) des molécules qui interfèrent de manière constructive en formant des complexes hybrides avec Tb^{3+} et en jouant un rôle d'antenne comme l'acide nicotinique.

Bien que les milieux liquides apparaissent comme des milieux déjà très complexes dans lesquels il sera difficile de doser l'acide nicotinique, nous avons voulu tester quelques milieux biologiques tels que l'urine, la salive et le condensat d'haleine. Le condensat d'haleine en particulier, est le milieu visé pour mieux comprendre les interférences potentielles des molécules présentes dans l'haleine, notre objectif final étant d'explorer la possibilité de mesurer l'acide nicotinique dans la phase gazeuse, l'haleine des patients.

V. Milieux biologiques

V.1 Objectifs de l'étude

La compatibilité de la méthode de détection de l'acide nicotinique dans des milieux biologiques a été évaluée. Pour rester dans l'optique finale de notre projet, les fluides biologiques au prélèvement le moins invasif ont été choisis. L'étude a porté sur la détection de l'acide nicotinique dans l'urine, la salive et le condensat d'haleine. Ces échantillons ont été obtenus de manières différentes et ont été fournis par bioMérieux. Le choix du condensat d'haleine permet de se rapprocher au maximum du milieu dans lequel nous voulons effectuer la détection de l'acide nicotinique. Pour mener à bien ces tests, nous avons tout d'abord procédé à l'analyse spectrophotométrique des différents échantillons biologiques.

V.1.1 L'urine

L'urine est un liquide de couleur jaune sécrété par les reins. La fonction des reins est la filtration du sang pour en évacuer les composés indésirables. L'urine est le moyen de transport de ces composés des reins vers l'extérieur, par l'intermédiaire de la vessie. L'urine est principalement constituée d'eau et peut contenir divers types de molécules en concentrations variables : l'urée, la créatinine, le chlorure de sodium et l'acide urique. Les formules de l'urée, la créatinine et l'acide urique sont présentés dans la Figure 61.

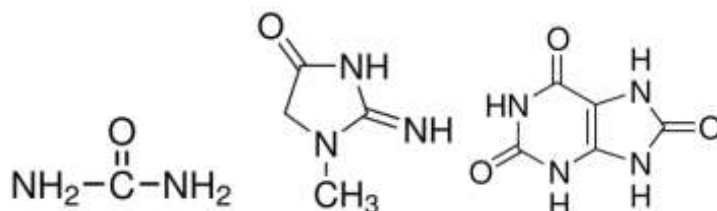


Figure 61. Représentation schématique (de la gauche vers la droite) de l'urée, la créatinine et l'acide urique, principaux composés chimiques retrouvés dans l'urine.

Cependant, il est également possible de retrouver dans l'urine des résidus de médicaments ou d'autres composés chimiques tels que des métabolites bactériens ou même des bactéries, signes d'un dysfonctionnement de l'organisme (maladies).

V.1.2 La salive

La salive est un liquide produit par les glandes salivaires dans la cavité buccale. Du fait de sa composition, la salive est principalement composée d'eau. Elle contient également des protéines, des enzymes comme l'amylase, et des ions. La salive contribue à faciliter la déglutition et a également un rôle antiseptique.

V.1.3 Le condensat d'haleine

Le condensat d'haleine est le résultat de la condensation de l'haleine. La condensation de l'haleine permet de concentrer par refroidissement les composés gazeux exhalés. On peut dénombrer quelques milliers de composés organiques volatils présents à des teneurs pouvant varier entre quelques ppb à quelques ppm. L'haleine contenant une grande quantité de vapeur d'eau, le condensat d'haleine contient en majorité des composés hydrosolubles, mais aussi des teneurs élevées en CO₂ (~40000 ppm).

L'urine, la salive et le condensat d'haleine ont été étudiés par spectrophotométrie UV-visible afin de connaître leur spectre d'absorption.

V.1.4 Préparation des échantillons

Les échantillons d'urine et de salive ont été obtenus à partir d'un seul volontaire. L'échantillon de condensat d'haleine a été obtenu en faisant souffler plusieurs volontaires, fumeurs et non-fumeurs, dans des flacons de prélèvement refroidis dans de l'azote liquide. Ces différents prélèvements ont ensuite été rassemblés pour obtenir un échantillon unique.

Une solution tamponnée d'hexamine 0,5 mol.L⁻¹ à pH 6,4 a été préparée. Un volume de cette solution a été incorporé aux échantillons pour obtenir une concentration d'hexamine en solution de 0,14 mol.L⁻¹ et un pH de 6,4 dans la solution :

- 560 µL de solution d'hexamine ont été ajoutés à 20 µL de salive ou d'urine pour obtenir des échantillons de salive et d'urine dans l'hexamine dilués au centième pour un volume final de 2 mL.
- Un volume de 700 µL de condensat d'haleine a été mélangé à 280 µL de solution d'hexamine pour obtenir une concentration d'hexamine de 0,14 mol.L⁻¹ dans un volume final de 1 mL.
- 40 µL d'une solution de nitrate de terbium à 0,01 mmol.L⁻¹ ont été ajoutés aux échantillons de salive et d'urine (20 µL dans l'échantillon de condensat d'haleine) et la luminescence a été mesurée. Un volume de 1 µL d'une solution d'acide nicotinique à 2 mmol.L⁻¹ a été ajouté par la suite aux échantillons de salive et d'urine (0,5 µL pour l'échantillon de condensat d'haleine) et la luminescence a été de nouveau mesurée.

Ces conditions sont résumées dans le Tableau 15.

Tableau 15. Volumes des réactifs pour la préparation des échantillons étudiés

Milieu	Volume utilisé, mL	V(hexamine) 0,5 mol.L ⁻¹ , mL	V(Tb(NO ₃) ₃) 0,01 mol.L ⁻¹ , µL	V(AN) 2 mmol.L ⁻¹ , mL	V _{total} , mL
Urine	0,02	0,56	40	0,001	2
Salive					
Condensat d'haleine	0,70	0,28	20	0,0005	1

V.1.5 Analyse spectrophotométrique des échantillons

La Figure 62 présente les résultats de l'analyse spectrophotométrique.

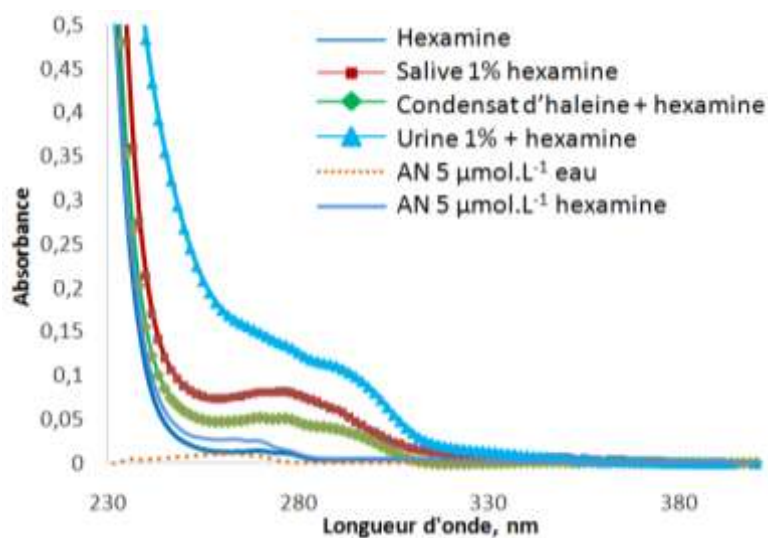


Figure 62. Spectres d'absorption des échantillons.

Cette figure montre que les trois fluides biologiques choisis absorbent dans l'UV et notamment à 260 nm, la longueur d'onde choisie pour l'excitation du complexe. Les valeurs d'absorbance à 260 nm sont précisées dans le Tableau 16.

Tableau 16. Absorbance des échantillons testés à 260 nm.

Echantillon	Hexamine	Salive 1 %	Condensat d'haleine	Urine 1 %	AN 5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ eau	AN 5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ hexamine
Absorbance à 260 nm	0,013	0,074	0,048	0,176	0,011	0,028

Ces valeurs indiquent que le condensat d'haleine, la salive et l'urine absorbent respectivement 1,7, 3,4 et 6,29 fois plus qu'une solution à 5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ d'acide nicotinique dans l'hexamine. Ces milieux peuvent potentiellement poser un problème pour la détection de l'acide nicotinique, en absorbant une partie du rayonnement incident. Un autre point à vérifier est de savoir si ces milieux induisent une augmentation de la luminescence de la molécule-sonde. L'étude de la luminescence du nitrate de terbium dans ces milieux a été menée dans le but de répondre à ces interrogations.

V.1.6 Influence du milieu biologique sur la luminescence de Tb^{3+} et la détection de l'acide nicotinique

La luminescence de la molécule-sonde dans chaque fluide a été observée avant d'ajouter 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ d'acide nicotinique au milieu pour observer de nouveau la luminescence de Tb^{3+} . Le Tableau 17 et la Figure 63 présentent les résultats de l'étude. En absence d'acide nicotinique, la luminescence de Tb^{3+} observée pour l'urine est de loin la plus intense. Ce résultat n'est pas étonnant puisqu'on s'attend à avoir de nombreux composés aux propriétés chélatantes tels que l'urée, la créatinine et l'acide urique. Les milieux salive et condensat d'haleine peuvent également être composés de composés interférents mais en plus faible quantité.

On observe lors de l'ajout d'acide nicotinique une augmentation de la luminescence de chacun des milieux. L'ajout de l'acide nicotinique correspond à une augmentation d'absorbance de 0,0029 à 260 nm pour chaque solution. Le pourcentage d'augmentation d'absorbance a été calculé car il pourrait être corrélé au % d'augmentation de la luminescence.

Tableau 17. Contribution de l'acide nicotinique à la luminescence du complexe Tb³⁺/AN en fonction du fluide biologique

	Abs (260nm)	Aire du pic			%(+Abs)	% de croissance de la luminescence
		Tb ³⁺ (200 μmol.L ⁻¹)	Tb ³⁺ /AN (200 /1)μmol.L ⁻¹	ΔA		
Hexamine	0,013	586 ± 121	986 ± 176	400 ± 214	+18,6	40 ± 24
Urine	0,176	5887 ± 76	6153 ± 38	253 ± 85	+1,62	4,5 ± 0,6
Salive	0,074	1441 ± 342	1607 ± 119	166 ± 362	+3,9	12 ± 8
Condensat d'haleine	0,048	1059 ± 97	1305 ± 146	247 ± 175	+5,81	23 ± 14

La courbe de la Figure 63 montre une bonne corrélation entre le pourcentage d'augmentation de luminescence de Tb^{3+*} et le pourcentage d'augmentation d'absorbance à 260 nm due à l'ajout de 1 μmol.L⁻¹ d'acide nicotinique. Ce résultat indique que malgré la complexité des milieux biologiques, il est possible de détecter la présence d'acide nicotinique. Toutefois, cette méthode de dosage implique d'avoir un témoin du milieu à analyser dénué d'acide nicotinique.

Un autre point important à noter pour la suite est que parmi les milieux biologiques explorés, la plus forte augmentation de luminescence de Tb³⁺ en présence d'acide nicotinique est observée pour le condensat d'haleine, dans lequel la contribution des molécules interférentes à l'absorbance à 260 nm est la plus faible.

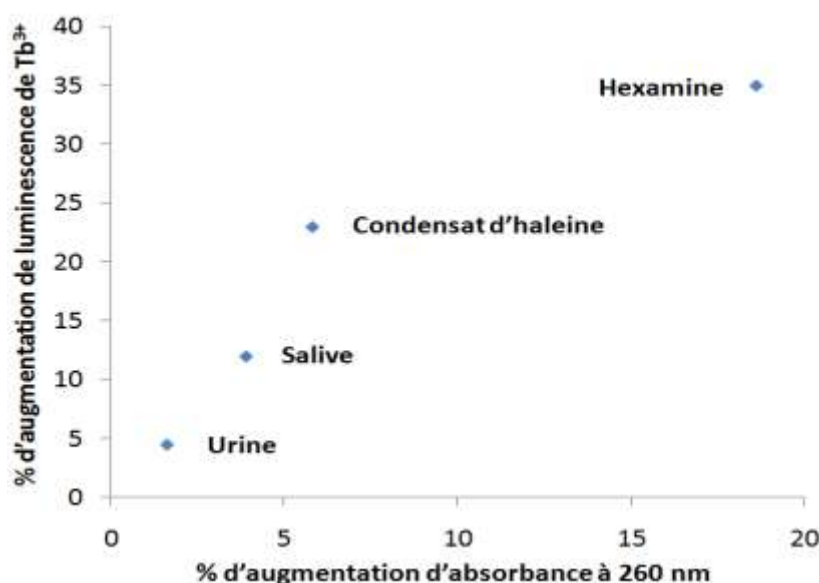


Figure 63. Corrélation entre le % d'augmentation de luminescence de Tb^{3+*} en fonction du % d'augmentation d'absorbance à 260 nm due à l'ajout de 1 μmol.L⁻¹ d'acide nicotinique

Phillips et al. [22] ont montré que les composés présents dans l'haleine en grande quantité appartiennent aux familles des alcanes, alcènes, alcools, aldéhydes et cétones ainsi que des dérivés alkylés du benzène. Les composés absorbants dans le domaine UV entre 230 et 300 nm sont essentiellement les aldéhydes, les cétones et dérivés benzéniques. Tous ces composés sont plus volatils que l'acide nicotinique et leur coefficient d'absorption à 260 nm est plus faible d'un facteur 10 à 15 par rapport à ce dernier. Dans une stratégie où l'objectif serait de quantifier l'acide nicotinique dans le condensat d'haleine, il serait possible de piéger dans une première étape les molécules les plus volatiles pour ne garder que celles qui sont hydrosolubles. Un tel piégeage des molécules dans la phase gazeuse est possible avec des capteurs nanoporeux.

VI. Conclusion

Les objectifs visés dans l'étude de la complexation entre Tb(III) et l'acide nicotinique en solution sont multiples. Il s'agissait tout d'abord d'optimiser le milieu réactionnel pour exalter la formation de complexe Tb/AN en agissant sur divers paramètres tels que la concentration des réactifs, le pH du milieu et la présence de tampons. Ce premier objectif a été partiellement atteint avec l'utilisation de milieux réactionnels tamponnés à l'hexamine avec un pH proche de la neutralité (pH = 6,4); dans ces milieux, l'acide nicotinique se trouve sous la forme déprotonée et anionique, la plus apte à se ligander avec le cation Tb^{3+} . Nous avons montré que la présence de l'hexamine induit trois effets sur les propriétés des complexes de Tb(III) : en l'absence d'acide nicotinique, l'hexamine déplace tout d'abord les molécules d'eau de la sphère de coordination de $Tb(NO_3)_3(H_2O)_3$, qui contribuent à la désactivation de la luminescence de Tb(III) excité. L'hexamine peut aussi jouer le rôle d'antenne et contribuer à augmenter le rendement de luminescence de Tb(III). Cependant, l'existence d'un couplage vibronique important entre Tb(III) excité et les oscillateurs CN de l'hexamine, semblable à celui existant entre Tb(III) excité et les oscillateurs OH de l'eau, réduit cet effet. De ce fait, la durée de vie des complexes hybrides de Tb(III) demeure inchangée et égal à $390 \pm 30 \mu s$, quel que soit le complexe, lorsque celui-ci est ligandé à des molécules d'hexamine.

Le second objectif était d'explorer la possibilité de détecter et de doser de faibles quantités d'acide nicotinique en milieu aqueux en présence de divers composés potentiellement interférents, eux-mêmes marqueurs secondaires de la tuberculose. Cette étude nous a tout d'abord permis de montrer qu'en l'absence de marqueur, le dosage de l'acide nicotinique est possible dans une large gamme de concentration de 400 nmol.L^{-1} à $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$, soit de 7,2 ppb à 1,8 ppm. Ce dosage est optimal lorsque la concentration d'AN est de $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$ et celle de l'hexamine de $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$ et pourrait encore être optimisé avec la désaération de la solution à analyser. En effet, la durée de vie de l'état triplet excité de l'acide nicotinique semble être suffisamment longue pour être partiellement désactivée par l'oxygène triplet, lorsque les solutions sont aérées. Par ailleurs, la limite de détection ici obtenue avec un spectrofluorimètre-phosphorimètre commercial a pu être améliorée par un des partenaires de COVADIS, le CEA-LETI [23], qui a mis au point un prototype fonctionnant avec une diode électroluminescente comme source d'excitation. Avec une même concentration de Tb(III) ($200 \mu\text{M}$) et d'hexamine ($0,14 \text{ M}$) mais avec une durée d'excitation plus longue de 700 s, la limite de détection atteinte est dans ce cas 250 pM, soit 4,5 ppt dans les solutions aqueuses contenant uniquement l'acide nicotinique. Des améliorations optiques pourraient donc permettre une amélioration du dosage de l'acide nicotinique.

La présence des divers marqueurs, nicotinate de méthyle, para-anisate de méthyle, phénylacétate de méthyle et o-phénylanisole (2-méthoxy biphényle), a pour effet de diminuer la

luminescence du complexe $Tb(\text{hexamine})_4(\text{AN})$. Nous avons montré que cette interférence destructive a pour origine une absorption compétitive entre le marqueur et l'acide nicotinique des photons d'excitation et que cette compétition est d'autant plus importante que le coefficient d'absorption du marqueur est élevé. Ces différents marqueurs ne jouent pas le rôle d'antenne. En revanche, un autre interférent, l'acide benzoïque utilisé très couramment comme conservateur dans l'alimentation, est capable de se ligander à $Tb(\text{III})$ et de jouer le rôle d'antenne en augmentant la luminescence de Tb^{3+} . Bien que l'acide nicotinique soit détectable même à très faible concentration en présence de grande quantité d'acide benzoïque, il sera difficile de distinguer la part de chacun dans un mélange à analyser de ces deux composés.

Même si le dosage direct de l'acide nicotinique en solution semble compromis, nous avons voulu tester l'aptitude de l'acide nicotinique à se ligander à $Tb(\text{III})$ dans des fluides biologiques comme l'urine, la salive et le condensat d'haleine. Les résultats de ces travaux montrent une corrélation entre l'augmentation d'absorbance et l'augmentation de luminescence induite par un ajout de $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ d'acide nicotinique, cette corrélation étant la plus faible dans l'urine et la plus élevée dans le condensat d'haleine. Ces résultats indiquent que la détection de faibles concentrations d'acide nicotinique dans des fluides biologiques reste compliquée, mais qu'une approche visant à sa détection en phase gazeuse reste envisageable. La réaction de complexation doit au préalable être étudiée en phase gazeuse, étape nécessitant la mise au point de matrices nanoporeuses et transparentes dopées de nitrate de terbium et leur exposition à des mélanges gazeux calibrés d'acide nicotinique.

De ce travail, les différents points pertinents à retenir pour la conception de capteurs nanoporeux pour la détection de l'acide nicotinique gazeux sont d'une part le pH intrapore des matrices choisies, qui devra être proche de la neutralité, et leur hydrophobicité pour éviter un piégeage important de la vapeur d'eau présente dans l'haleine. Avant d'aborder l'étude de la complexation de l'acide nicotinique gazeux avec un sel de $Tb(\text{III})$ confiné dans les pores d'une matrice nanoporeuse, nous produirons tout d'abord diverses matrices dont le pH intrapore sera sondé en présence de vapeur d'eau et de gaz carbonique.

Bibliographie

1. Chen, W. and S. Fukuzumi, *Ligand-Dependent Ultrasonic-Assistant Self-Assemblies and Photophysical Properties of Lanthanide Nicotinic/Isonicotinic Complexes*. Inorganic Chemistry, 2009. **48**(8): p. 3800-3807.
2. Parker, D., *Luminescent lanthanide sensors for pH, pO₂ and selected anions*. Coordination Chemistry Reviews, 2000. **205**: p. 109-130.
3. Lenaerts, P., C. Gorller-Walrand, and K. Binnemans, *Luminescent europium(III) and terbium(III) nicotinate complexes covalently linked to a 1,10-phenanthroline functionalised sol-gel glass*. Journal of Luminescence, 2006. **117**(2): p. 163-169.
4. Velazquez, J.J., et al., *Increase in the Tb³⁺ green emission in SiO₂-LaF₃ nano-glass-ceramics by codoping with Dy³⁺ ions*. Journal of Applied Physics, 2010. **108**(11).
5. Latva, M., et al., *Correlation between the lowest triplet state energy level of the ligand and lanthanide(III) luminescence quantum yield*. Journal of Luminescence, 1997. **75**(2): p. 149-169.
6. Pearson, R.G., *Hard and soft acids and bases*. . Journal of the American Chemical Society, 1963. **85**(22): p. 3533-&.
7. Krasnova, A.I., M.P. Aguilar-Caballo, and A. Gomez-Hens, *Selective determination of nicotinic acid and nicotinamide using terbium(III) sensitised luminescence*. Analytica Chimica Acta, 2001. **441**(2): p. 249-256.
8. Lewandowski, W. and H. Baranska, *Comparison of the effect of Lanthanides (Ln), D-transition metals and selected metals of the main groups on the aromatic system of salicylic acid and benzoic acids*. . Journal of Molecular Structure, 1988. **174**: p. 417-421.
9. Arnaud, N. and J. Georges, *Improved detection of salicylic acids using terbium-sensitized luminescence in aqueous micellar solutions of cetyltrimethylammonium chloride*. Analyst, 1999. **124**(7): p. 1075-1078.
10. Rollet, F., C. Richard, and J.P. Aguer, *Laser flash photolysis study of nicotinic acid in water*. Journal of Photochemistry and Photobiology a-Chemistry, 2002. **153**(1-3): p. 33-40.
11. Cooney, A.P., M.R. Crampton, and P. Golding, *The acide-base behavior of hexamine and its N-acetyl derivatives*. . Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 2, 1986(6): p. 835-839.
12. Walsh, M.I., et al., *Spectrofluorimetric Determination of Famotidine in Pharmaceutical Preparations and Biological Fluids. Application to Stability Studies*. Journal of Fluorescence, 2009. **19**(2): p. 333-344.
13. Bunzli, J.C.G. and M.M. Vuckovic, *FT-IR and fluorometric investigation of rare-earth and metallic ion solvation. 4. Spectroscopic properties of anhydrous and aqueous solutions of terbium perchlorate and nitrate - Coordination number of the Tb(III) ion*. . Inorganica Chimica Acta-Articles, 1983. **73**(1): p. 53-61.
14. Chen, W.T. and S. Fukuzumi, *Ligand-Dependent Ultrasonic-Assistant Self-Assemblies and Photophysical Properties of Lanthanide Nicotinic/Isonicotinic Complexes*. Inorganic Chemistry, 2009. **48**(8): p. 3800-3807.
15. Moore, J.W., W.A. Baker, and M.D. Glick, *Crystal structure of hydrated Lanthanide(III) nicotinate, La₂(C₅H₄NCO₂)₆(H₂O)₄ and Sm₂(C₅H₄NCO₂)₆(H₂O)₄*. Journal of the American Chemical Society, 1972. **94**(6): p. 1858-&.
16. Arnaud, N. and J. Georges, *Comprehensive study of the luminescent properties and lifetimes of Eu³⁺ and Tb³⁺ chelated with various ligands in aqueous solutions: influence of the synergic agent, the surfactant and the energy level of the ligand triplet*. Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2003. **59**(8): p. 1829-1840.
17. Horrocks, W.D. and D.R. Sudnick, *Lanthanide ion probes of structure in biology - Laser-induced luminescence decay constants provide direct measure of the number of metal-coordinated water molecules*. Journal of the American Chemical Society, 1979. **101**(2): p. 334-340.

18. Bunzli, J.C.G. and M.M. Vuckovic, *FT-IR and fluorometric investigation of rare-earth and metallic ion solvation. 4. Spectroscopic properties of anhydrous and aqueous solutions of terbium perchlorate and nitrate - Coordination number of the Tb(III) ion*. Inorganica Chimica Acta-Articles, 1983. **73**(1): p. 53-61.
19. Cable, M.L., et al., *Detection of Bacterial Spores with Lanthanide-Macrocycle Binary Complexes*. Journal of the American Chemical Society, 2009. **131**(27): p. 9562-9570.
20. Zalewicz, M., *Preparation and hexamination of properties of lanthanide chloride salts with hewamethylenetetramine*. Monatshefte Fur Chemie, 1990. **121**(4): p. 249-257.
21. Syhre, M. and S.T. Chambers, *The scent of Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculosis, 2008. **88**(4): p. 317-323.
22. Phillips, M., et al., *Variation in volatile organic compounds in the breath of normal humans*. Journal of Chromatography B, 1999. **729**(1-2): p. 75-88.
23. Hue, J., et al., *Towards an easy-to-use tuberculosis diagnosis through exhaled breath analysis A liquid fluorimeter with an excitation at 265 nm*. Frontiers in Biological Detection: From Nanosensors to Systems V, 2013. **8570**.

CHAPITRE III

Etude du pH intrapore des matrices nanoporeuses

I. Introduction

L'eau est un interférent majeur pour tous les capteurs de gaz et de composés organiques volatils, quel que soit le mode de transduction. La vapeur d'eau est en effet présente dans l'atmosphère à des concentrations bien plus élevées que celles de la plupart des analytes-cible à mesurer. Les concentrations de ces derniers avoisinent quelques ppb à quelques dizaines de ppb alors que celle de la vapeur d'eau, selon l'hygrométrie de l'air et de la température peut atteindre plusieurs dizaines de milliers de ppm. Lorsqu'il s'agit de mesurer des composés volatils, marqueurs de la tuberculose dans l'haleine, les interférents sont nombreux et on ne dénombre pas moins de quelques milliers de composés organiques volatils présents à des concentrations variables entre quelques centaines de ppq à quelques dizaines de ppm [1]. La vapeur d'eau et le gaz carbonique exhalés sont les deux principaux interférents car leur concentration est très élevée ; ainsi la teneur de vapeur d'eau de l'air est 25000 ppm (la concentration dans l'air expiré est de l'ordre de 60000 ppm en considérant que l'haleine a une humidité relative de 100% d'humidité à 37°C) alors que celle du CO₂ est de l'ordre de 400 ppm dans l'air extérieur (la concentration de dioxyde de carbone dans l'air expiré peut être estimée entre 40000 et 50000 ppm) [1],[2].

Pour les capteurs nanoporeux qui sont mis au point au laboratoire, l'eau et le CO₂ peuvent interférer de deux manières ; ils sont plus efficacement piégés dans la matrice du fait de leur forte concentration comparée à celle de l'acide nicotinique et des autres marqueurs et ils peuvent modifier le pH intrapore, notamment lorsque le gaz carbonique piégé se dissout dans l'eau intrapore pour produire de l'acide carbonique. Or, il n'existe pas à notre connaissance d'études dédiées à la connaissance du pH intrapore dans des matériaux poreux à base de silicate. Certains capteurs à base de films minces de silicates dopés de colorants sensibles au pH ont été utilisés pour mesurer le pH des solutions à analyser [3], [4], [5], [6]. Ces divers travaux n'ont cependant pas permis de mettre en évidence ni de quantifier l'effet de l'eau sur la solvataion des colorants et sur l'équilibre acido-basique régi par le pH intrapore. Nous discuterons des résultats de la littérature à la lumière des résultats de ce présent travail.

L'objectif de ce chapitre est d'apporter des réponses à de nombreuses questions relatives au processus de solvataion des molécules et au transfert de proton à l'échelle moléculaire dans les nanoréacteurs que constituent les pores des matériaux poreux à base de silicates. Nous essaierons de quantifier la vitesse de piégeage des molécules d'eau dans diverses matrices poreuses en fonction de leur porosité ainsi que de leurs propriétés hydrophyle ou hydrophobe. Nous essaierons en particulier de déterminer la concentration d'eau minimale, nécessaire à un processus de transfert de proton à l'eau intrapore. Par ailleurs, nous mettrons en œuvre diverses expériences pour comprendre les effets du CO₂ piégé et dissous dans les pores sur le pH intrapore.

Dans cet objectif, nous avons utilisé trois matrices nanoporeuses différentes dopées d'un colorant sensible au pH, le bleu de bromothymol (BBT). La première matrice, réalisée à partir du TMOS seul, est la plus acide du fait de la présence des groupements Si-OH résiduels dus à une polycondensation incomplète. Les deux autres matrices hybrides de TMOS et d'APTES contiennent des proportions différentes de groupements Si-OH résiduels et de chaînes aminopropyle, leur conférant une acidité ou basicité différente.

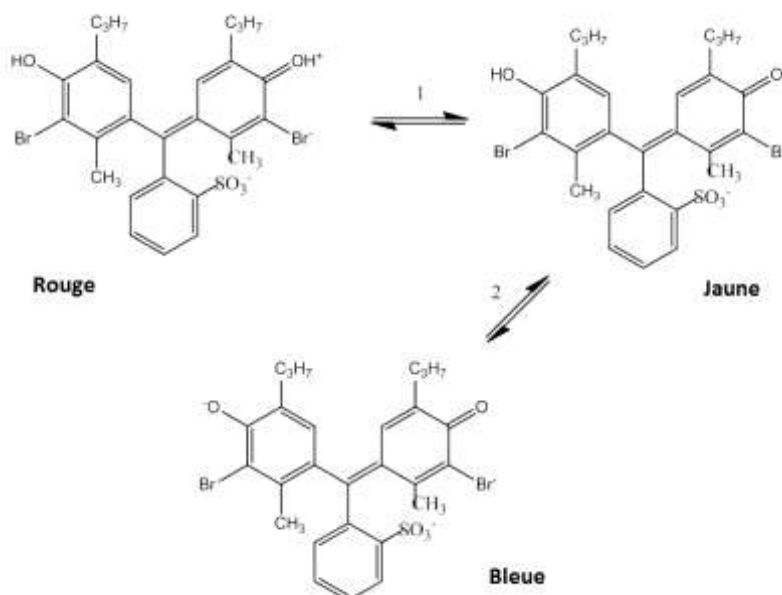


Figure 64. Equilibres acido-basique du bleu de bromothymol avec $pK_a(1) = -1,17$ et $pK_a(2) = 7,1$

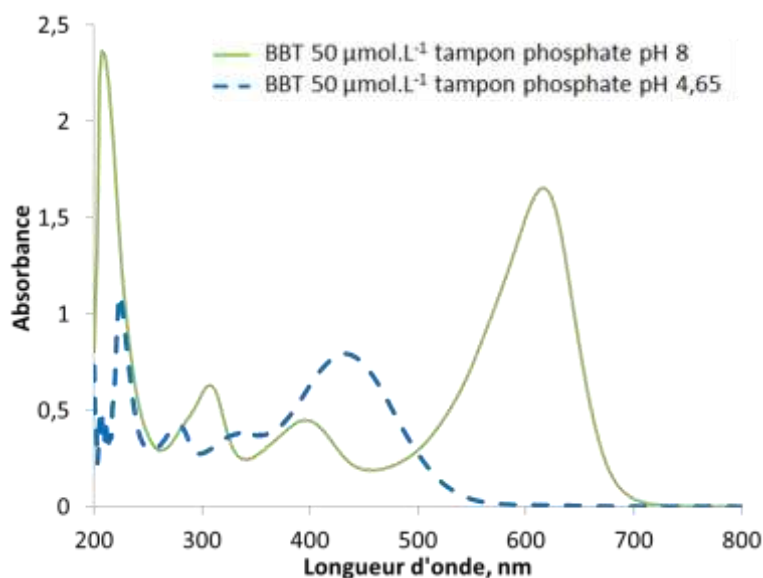


Figure 65. Spectres d'absorption du BBT $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ dans des solutions aqueuses tamponnées à pH 4,65 et 8 avec respectivement $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ d'acétate de sodium et $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ de phosphate de potassium.

Le bleu de bromothymol a été choisi comme molécule-sonde pour l'étude du transfert de proton intrapore, car il possède un pK_a égal à 7,1 proche du pH de l'eau déionisée et sera sensible aux faibles variations de pH. De plus, les formes acides (jaune) et basiques (bleue) mises en jeu dans l'équilibre acido-basique 2 (Figure 64) présentent des bandes d'absorption dans le visible (Figure 65)

avec des coefficients d'extinction molaire élevés. Il sera donc possible de doper les matrices de silicates avec de faibles concentrations de BBT tout en ayant des absorbances mesurables. Par ailleurs, quelques travaux de la littérature rapportent des sondes à pH à base de matériaux poreux élaborés selon le procédé sol-gel et dopés de BBT [7], [5, 6]. Nous pourrions comparer nos résultats à ceux de la littérature.

Tableau 18. Propriétés optiques du BBT dans différents milieux

Système	Longueur d'onde (nm)	ϵ (mol ⁻¹ .L.cm ⁻¹)
BBT dans tampon acétate	433	16000±1000
BBT dans tampon phosphate	616	33400±3000
BBT dans méthanol	421	17700±1000
BBT forme acide dans l'eau	436	18000 [8]
BBT forme basique dans l'eau	616	43000 [8] ⁹

Les matrices dopées de BBT seront exposées à de la vapeur d'eau suivant deux modes d'exposition statique et dynamique. Avec l'exposition dynamique, il sera possible de faire varier de façon précise la concentration de vapeur d'eau dans le mélange gazeux en absence et en présence de CO₂. Les dispositifs utilisés pour ces expériences sont décrits un peu plus tard dans ce chapitre.

II. Synthèse des matrices nanoporeuses dopées de BBT par voie sol-gel

II.1 Le procédé sol-gel

Le procédé sol gel est un procédé de synthèse de matériaux à base d'oxydes métalliques. Il s'agit de la conversion d'alcoxyde métalliques en solution en un réseau tridimensionnel d'oxydes métalliques solide par une succession d'étapes d'hydrolyse-condensation. L'appellation Sol-Gel est une contraction des termes Solution-Gélification et décrit les deux états par lesquels passe le matériau.

Le premier état est le sol. Le sol est une dispersion colloïdale d'oligomères de tailles différentes dépendant du niveau d'avancement de la polymérisation.

Le gel est un réseau tridimensionnel formé d'oxydes métalliques reliés par liaisons covalentes.

Il existe deux voies de synthèse de matériaux par le procédé Sol-Gel :

- la voie organique ou colloïdale, utilisant des sels métalliques comme précurseurs en solution aqueuse. Les précurseurs sont peu coûteux mais la réaction est difficilement contrôlable.
- la voie métal organique ou polymérique, utilisant des alcoxydes métalliques en solution hydro organique. Les précurseurs alcoxydes sont plus coûteux que les sels métalliques mais la réaction permet un contrôle facile de la granulométrie et de la porosité du matériau.

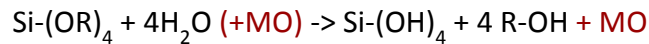
Dans les deux cas, la réaction est initiée par hydrolyse (ajout d'eau pour la voie métal organique et changement de pH pour former des hydroxydes pour la voie inorganique) permettant la formation de groupements M-OH. La condensation succède ensuite pour former des liaisons M-O-M. Nous avons procédé à la mise au point des capteurs en utilisant comme précurseurs des alcoxydes de silicium, et nous décrirons par la suite uniquement la synthèse suivant cette voie.

⁹ Le coefficient d'extinction molaire du BBT a été mesuré en solution d'hydroxyde de sodium 0,1 mol.L⁻¹ à pH 12

Les étapes d'hydrolyse et de condensation

Durant l'hydrolyse, les précurseurs de silice et l'eau sont mélangés dans une phase organique (formant ainsi le sol). Des molécules organiques (MO) ou des sels métalliques peuvent être incorporés dans le sol pour être piégés dans le matériau final lors de la polycondensation. Les groupements Si-OR des précurseurs sont hydrolysés en groupements Si-OH.

Initiation : hydrolyse des précurseurs alcoxydes



Lors de la condensation, les groupements Si-OH se condensent pour former des ponts Si-O-Si et étendre la polymérisation

Polycondensation : condensation des groupements silanol



La polycondensation entraîne une augmentation de la viscosité du milieu, qui conduit à la formation du gel. La polymérisation se poursuit pendant le vieillissement du gel. La réticulation du matériau conduit à l'expulsion du solvant piégé et à une réduction de la taille du matériau. Il s'agit du phénomène de synérèse. Indépendamment de la synérèse, plusieurs types de séchage peuvent être mis en oeuvre pour obtenir des matériaux de formes différentes.

Les méthodes de mise en forme

Le séchage du matériau se produit lorsque le solvant et l'eau sont évacués du matériau, entraînant la synérèse. Le séchage du gel peut être forcé pour donner au matériau des formes et propriétés différentes, qui dépendront de la méthode de séchage utilisée. Les méthodes de dépôt de films minces sur substrat seront décrites dans le chapitre suivant.

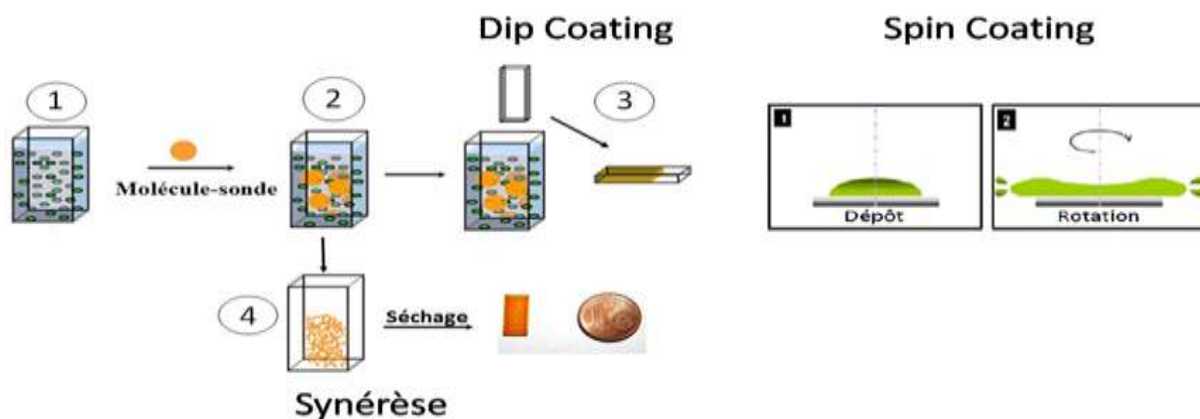


Figure 66. Différentes méthodes de mises en forme de matrices nanoporeuses à partir d'un sol.

Le moulage

Le moulage permet l'obtention de matrices monolithiques dont la forme est gouvernée par le moule utilisé. Le séchage du gel doit être effectué lentement car un séchage trop rapide entraîne l'apparition de fissure et fragilise le matériau, conduisant à la formation de matrices fracturées. Le séchage est alors effectué en recouvrant le moule d'une membrane semi-perméable, permettant

une lente évacuation du solvant, dans une enceinte balayée par un flux de gaz inerte à un débit inférieur à 500 mL.min⁻¹.

II.2 Préparation des matrices dopées de BBT

Les matrices sont préparées à base de TMOS, d'APTES, de méthanol et d'eau. Deux types de matrices hybrides différenciées par leur pourcentage respectif de TMOS et d'APTES ont été préparés. Le pourcentage de TMOS et d'APTES est respectivement de 97 et 3 % et de 80 et 20 %. Des matrices vierges sans BBT et des matrices dopées de BBT à une concentration de 100 µmol.L⁻¹ dans le sol ont été préparées dans chaque cas. Le sol est versé dans des moules en polypropylène munis de cavités parallélépipédiques de dimensions 16*10*2 mm et de 0,32 mL de volume. Ces moules présentent 350 cavités. Pour un volume de sol de 120 mL, les volumes de réactifs utilisés sont indiqués dans le Tableau 19.

Tableau 19. Volumes des réactifs utilisés pour la préparation des matrices inorganiques et hybrides.

%	TMOS		TMOS/APTES 97/3		TMOS/APTES 80/20	
	Volume mL	Concentration mol.L ⁻¹	Volume mL	Concentration mol.L ⁻¹	Volume mL	Concentration mol.L ⁻¹
TMOS	80,84	4,527	40,661	2,277	32,432	1,816
APTES	/	/	1,978	0,07	12,751	0,454
Méthanol	/	/	57,055	11,738	55,179	11,352
Eau	39,16	18,11	20,306	9,391	19,638	9,082

Les matrices dopées de colorants sont préparées par ajout d'un volume d'une solution mère de colorant à 2 mmol.L⁻¹, préparée dans le méthanol. Une partie du volume de méthanol calculé est remplacée par le volume de solution mère de BBT.

Tableau 20. Volume de solution de BBT 2 mmol.L⁻¹ dans le méthanol à ajouter dans le sol pour le dopage des matrices TMOS/APTES.

% TMOS/APTES	97/3	80/20
Concentration de BBT dans le sol, mol.L ⁻¹	10 ⁻⁵ -10 ⁻⁴	
Volume de solution de BBT à 2 mmol.L ⁻¹ , mL	6	
Volume de méthanol, mL	51,055	49,179

Tableau 21. Volume de solution de BBT 2 mmol.L⁻¹ dans l'eau à ajouter dans le sol pour le dopage des matrices TMOS/eau.

Rapport molaire TMOS/eau	1/4
Concentration de BBT dans le sol, mol.L ⁻¹	10 ⁻⁵ -10 ⁻⁴
Volume de solution de BBT à 2 mmol.L ⁻¹ , mL	6
Volume d'eau, mL	33,16

La synthèse des matrices TMOS/APTES est effectuée dans un bain thermostaté à basse température. La température du bain était de -20°C pour les matrices à 3% d'APTES et -40°C pour les

matrices à 20% d'APTES. Les réactifs sont introduits dans l'ordre suivant et le sol est agité de manière continue :

- méthanol + solution de BBT
- TMOS (le TMOS précipite pour des températures inférieures à -20°C , il se forme un précipité blanc de TMOS dans le sol à 20% d'APTES jusqu'à ajout de l'eau).
- APTES
- eau

Le sol est versé dans le moule qui est recouvert avec une membrane aluminium pour une maturation pendant 4 jours. Au bout des 4 jours, la membrane d'aluminium est remplacée par une membrane poreuse qui permet l'évaporation des solvants. Le séchage dure encore trois semaines à température ambiante au bout desquelles on obtient des monolithes secs de volume réduit. Le coefficient de rétractation du volume est de 6,78 pour les monolithes à 3 % d'APTES et de 7,05 pour les matrices à 20 % d'APTES.

La synthèse des matrices TMOS/eau est réalisée en chauffant le sol à 70°C . Le TMOS est introduit en premier, puis l'eau et la solution aqueuse de BBT sont ajoutées. Le mélange est laissé à chauffer pendant 23 min (gélification à environ 25 minutes), les deux phases non miscibles ne forment alors plus qu'une seule phase homogène et translucide. Le séchage est effectué de la même manière que pour les matrices contenant de l'APTES. Le coefficient de rétractation de volume est de 3,88.

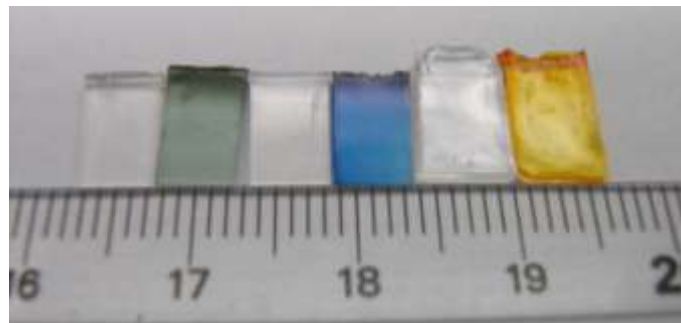


Figure 67. De gauche à droite : matrices TMOS/APTES 97/3 vierge et dopée de BBT, matrices TMOS/APTES 80/20 vierge et dopée de BBT et matrices TMOS vierge et dopée de BBT

III. Caractérisations des matrices

Les paramètres de porosité des matrices monolithiques ont été caractérisés en acquérant l'isotherme d'adsorption-désorption de l'azote, à la température de l'azote liquide, de chaque échantillon de monolithe broyé. L'isotherme est analysée à l'aide de diverses méthodes analytiques qui permettent de déduire la surface spécifique d'adsorption, le volume poreux et la distribution des tailles de pores. (voir Annexe du chapitre III paragraphe II.3). Des mesures d'angles de contact ont également été effectuées sur les monolithes pour évaluer le caractère hydrophile des matrices.

Pour les films minces déposés sur des substrats en quartz, des mesures d'angle de contact ont été effectuées pour déterminer le caractère hydrophile ou hydrophobe et les mesures de profilométrie pour déterminer les épaisseurs des films déposés à la tournette.

III.1.1 Détermination des paramètres de porosité des monolithes

Les isothermes d'adsorption de l'azote ont été établis pour les monolithes issus des diverses formulations par voie sol-gel. Deux exemples sont ici montrés avec un matériau microporeux tel que la matrice TMOS pur (figure 68) et un matériau à la fois microporeux mais surtout mésoporeux tel que la matrice hybride TMOS/APTES 97/3 (figure 69). Les surfaces spécifiques d'adsorption ont été déduites en utilisant la méthode analytique de Brunauer, Emmet et Taylor (BET). La répartition de la taille des pores en surface d'adsorption et en volume poreux est déterminée à l'aide de la théorie de la fonctionnelle de densité (DFT) et permet de connaître la quantité de micropores ($2 < \text{diamètre} < 20 \text{ \AA}$), de mésopores ($20 < \text{diamètre} < 500 \text{ \AA}$) et de macropores ($500 \text{ \AA} < \text{diamètre}$). Les paramètres de porosité obtenus pour les diverses matrices vierges et dopées de BBT sont collectées dans le tableau 22.

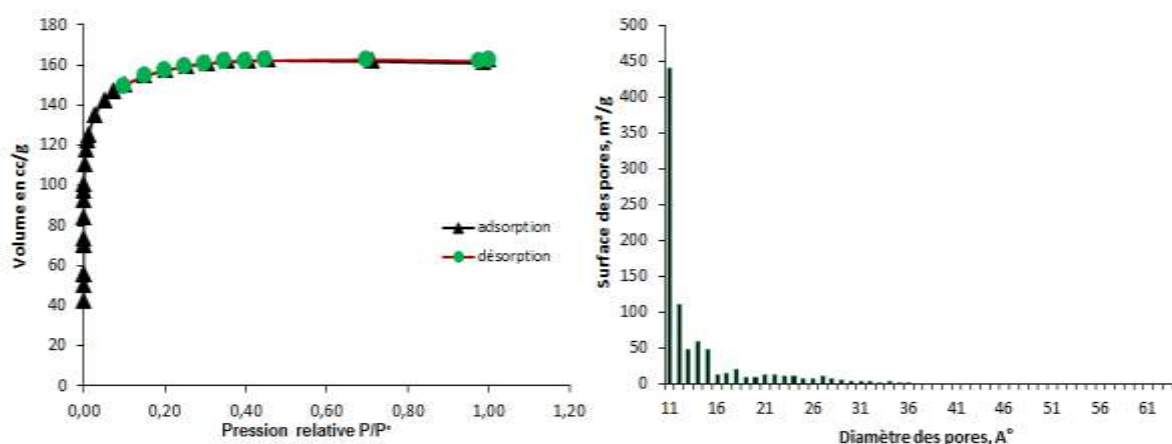


Figure 68. Isotherme d'adsorption-désorption d'azote et répartition des tailles de pores en surface pour une matrice TMOS/eau 1/4.

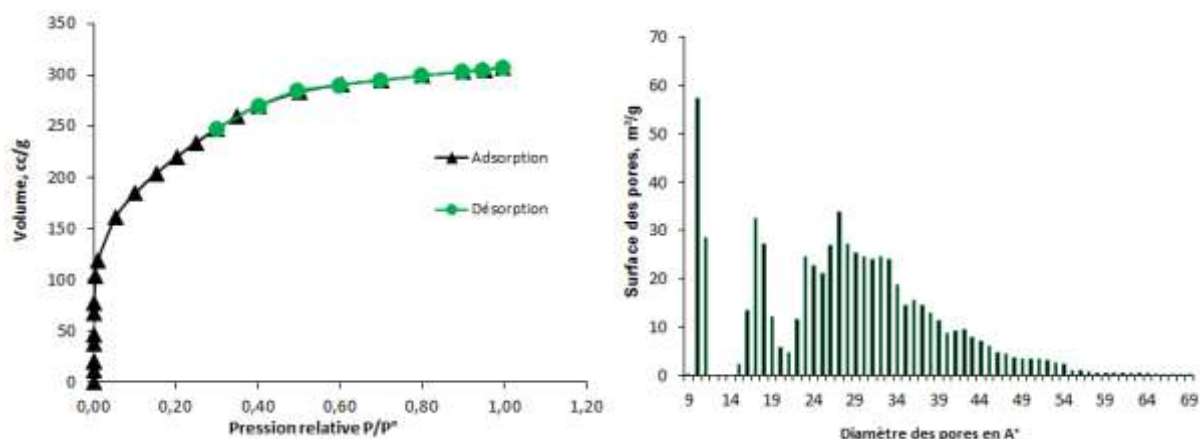


Figure 69. Isotherme d'adsorption-désorption d'azote et répartition des tailles de pores en surface pour une matrice TMOS/APTES 97/3.

Tableau 22. Paramètres de porosité des matrices

matrice	Volume poreux, $\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$	Surface spécifique BET, $\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$	Surface spécifique DFT, $\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$
TMOS APTES 97/3 (vierge)	$0,48 \pm 0,06$	740 ± 80	760 ± 70
TMOS/APTES 80/20 (dopée)	$0,31 \pm 0,05$	320 ± 30	390 ± 50
TMOS (dopée)	$0,25 \pm 0,05$	600 ± 70	870 ± 90

La matrice de TMOS pur est essentiellement microporeuse. Elle est constituée de 89 % de pores microporeux (<20Å) et 11 ± 1 % de pores mésoporeux s'étendant jusqu'à 38 Å. Les pores de diamètre égal 11 Å contribuent majoritairement à la surface spécifique d'adsorption. De ce fait le volume poreux est faible, de 0,25 cm³.g⁻¹. A l'inverse, la matrice à 3 % d'APTES est essentiellement mésoporeuse et est constituée de 78 % de mésopores et de 22 % de micropores. La distribution des tailles de pores couvre le domaine de 8 à 70 Å et est centrée autour de 27 Å. En augmentant le pourcentage d'APTES à 20%, on obtient une matrice presque totalement mésoporeuse (voir annexe du chapitre III) avec des diamètres compris entre 18 et 70 Å. La répartition de taille est centrée autour d'un diamètre de 30 Å. Les chaînes aminopropyle en grande quantité occupent une surface et un volume poreux non négligeable. De ce fait, la surface spécifique d'adsorption diminue à 390 m².g⁻¹ et le volume poreux n'est plus que de 0,31 cm³.g⁻¹.

III.1.2 Mesures d'angle de contact sur monolithes

Le caractère hydrophile/hydrophobe des matrices a été déterminé par des mesures d'angle de contact (voir Annexe du chapitre III). Une goutte d'eau de 2 µL est déposée sur la surface des matrices et l'étalement de la goutte est observé. La forme de la goutte à la surface du matériau nous renseigne sur l'affinité de la goutte pour la surface du matériau et donc le caractère hydrophile ou hydrophobe de la matrice. Les mesures d'angle de contact ont été effectuées sur les trois types de matrices dopées de BBT. En raison de l'existence d'un gradient de concentration de BBT au sein des monolithes, deux mesures ont été effectuées sur chaque matrice, une dans la partie la plus proche du ménisque des matrices, zone plus concentrée, et une dans la partie basse, moins concentrée. Les mesures présentées dans la figure 70 concernent la matrice TMOS/APTES 97/3. Les clichés pour les matrices à 20 % d'APTES et TMOS seul sont présentés dans l'annexe du chapitre III paragraphe II.5.

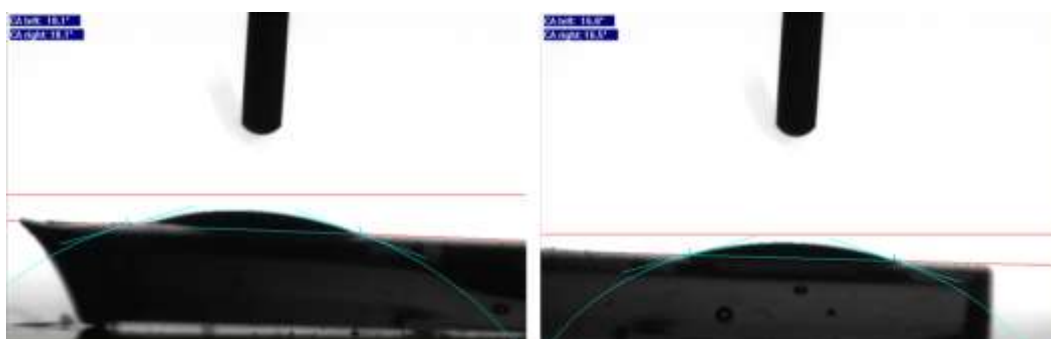


Figure 70. Mesures d'angle de contact sur monolithe TMOS/APTES 97/3.

Tableau 23. Mesures d'angle de contact sur différentes matrices dopées de BBT. Les deux valeurs présentées dans la partie gauche correspondent au dépôt de la goutte dans la zone la plus concentrée.

Matrice	Mesure				moyenne	Ecart-type
TMOS/APTES 97/3	18,1	18,1	16,8	16,5	17	1
TMOS/APTES 80/20	12,1	12,5	17	17	15	3
TMOS/eau 1/4*	37,2	38,2			38	1

*Seul le premier dépôt était exploitable.

Les valeurs moyennes des angles de contact sont toutes bien inférieures à 90°. Les matrices sont toutes hydrophiles comme nous le verrons par la suite avec les expositions à de la vapeur d'eau.

IV. Expositions des matrices vierges et dopées de BBT

IV.1 Exposition statique

Dans cette expérience, une matrice poreuse est déposée sur une grille disposée au-dessus d'une cuve d'eau placée dans une enceinte fermée. La matrice, exposée à la vapeur saturante d'eau, est pesée à intervalles réguliers avant et après chaque exposition pendant une durée totale d'exposition de 512 minutes. Après chaque pesée, un spectre UV-visible-proche IR est collecté entre 300 à 2500 nm. Il sera ainsi possible de mesurer la quantité maximale d'eau que peut adsorber la matrice et de déduire un volume poreux qui sera comparé à celui mesuré par porosimétrie. Par ailleurs, nous pourrions également déterminer la vitesse d'adsorption de l'eau et corréler l'intensité des bandes d'absorption liées à l'eau à la masse d'eau adsorbée. Ces paramètres sont dépendants des propriétés de porosité et du dopage des matrices et seront déterminés pour les matrices TMOS, TMOS/APTES 97/3 et TMOS/APTES 80/20 vierges et dopées de BBT.



Figure 71. Cellule d'exposition statique des monolithes aux vapeurs saturantes d'eau. Le monolithe est déposé sur la grille en acier inoxydable. Le flacon de 6 cm de diamètre et de 6,8 cm de hauteur est rempli de 5 mL d'eau et fermé hermétiquement lors de l'exposition.

IV.1.1 Exposition d'une matrice de TMOS dopée de BBT à de la vapeur d'eau

La première expérience est réalisée avec une matrice de TMOS de $0,082 \text{ cm}^3$ de volume, dopée de bleu de bromothymol. L'objectif est de connaître le pH intrapore dû à la présence des groupements Si-OH résiduels dans la matrice et la quantité maximale d'eau présente dans les pores.

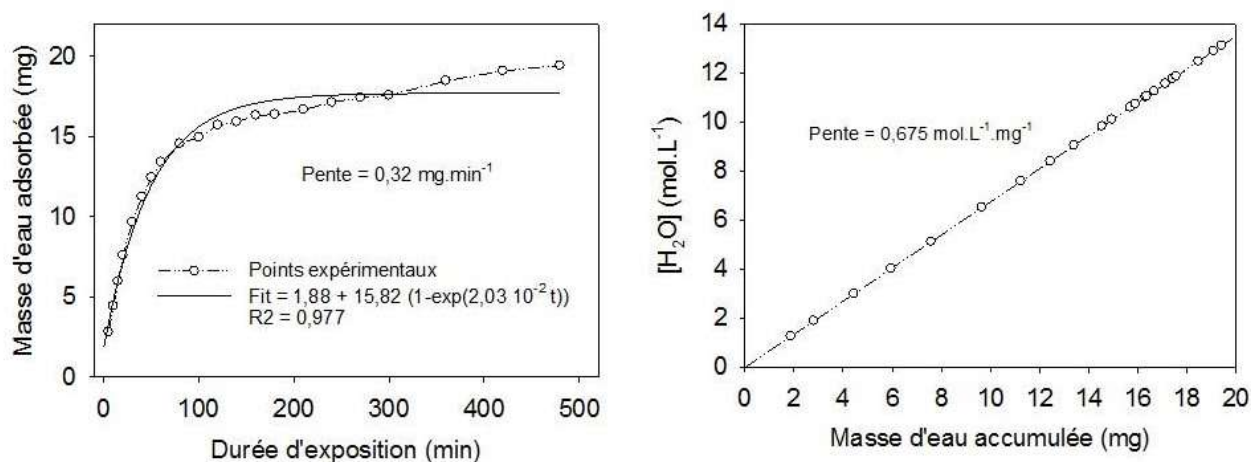


Figure 72. Gauche : Masse d'eau accumulée dans une matrice TMOS de $0,082 \text{ cm}^3$ de volume dopée de BBT $2,7 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ en fonction de la durée d'exposition à de la vapeur saturante d'eau, droite : Concentration d'eau dans les pores en fonction de la masse d'eau accumulée au cours du temps

La Figure 72 montre l'évolution de la masse d'eau accumulée au cours de l'exposition. La matrice est saturée au bout d'environ 480 min. Une loi de croissance exponentielle à plateau a été appliquée pour rendre compte de la vitesse de piégeage des molécules d'eau. On voit que la vitesse de remplissage des pores est très rapide dans la première centaine de minutes et qu'elle est ralentie au-delà. Cet effet est probablement dû aux tailles petites des pores de ce matériau essentiellement microporeux. La valeur au plateau correspond à la masse maximale d'eau adsorbée à partir de laquelle est déduit le volume poreux de la matrice. La matrice contient initialement de l'eau, dont la quantité peut être déduite de la courbe. Elle est égale à 1,88 mg. En tenant compte de cette masse d'eau, la matrice sèche pèse alors 75,32 mg. La vitesse d'adsorption d'eau, de $0,32 \text{ mg}\cdot\text{min}^{-1}$, est rapide car la matrice TMOS est hydrophile. La masse d'eau atteinte lorsque la matrice est saturée est de 19,43 mg, soit 25,8% de son poids initial.

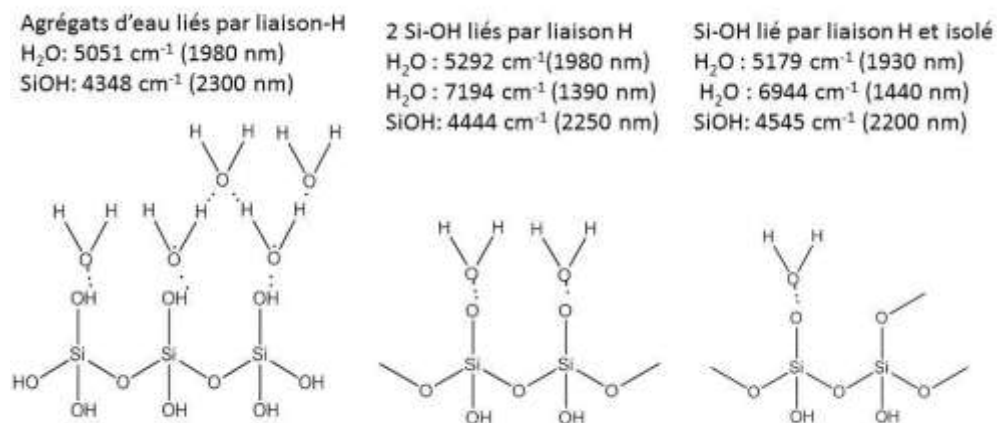


Figure 73. Représentation schématique des structures moléculaires présentes dans les matrices de silice en corrélation avec les fréquences de vibration observées dans le proche-IR selon Wood et al. [9]

Les spectres d'absorption dans le proche IR collectés au cours de l'exposition témoignent de l'adsorption d'eau dans la matrice au cours du temps. On observe une augmentation très rapide des bandes vibrationnelles des Si-OH résiduels qui sont liés aux molécules d'eau ainsi que la présence d'agrégats d'eau (Figure 73). L'évolution des intensités des transitions vibrationnelles à 1440, 1980 et 2300 en fonction de la durée d'exposition et de la quantité d'eau piégée dans le monolithe TMOS dopé de BBT est montrée dans la Figure 74. On observe une bonne corrélation entre l'augmentation des intensités des absorbances et la vitesse d'adsorption d'eau de la matrice. En effet, la saturation est atteinte dès la centaine de minutes d'exposition.

La Figure 75 montre l'évolution des absorbances des bandes proche-IR des groupements SiOH en fonction de la quantité d'eau accumulée dans la matrice. Ces absorbances varient linéairement en fonction de la masse d'eau et peuvent être utilisées pour déterminer donnée la quantité d'eau présente dans une matrice donnée de TMOS.

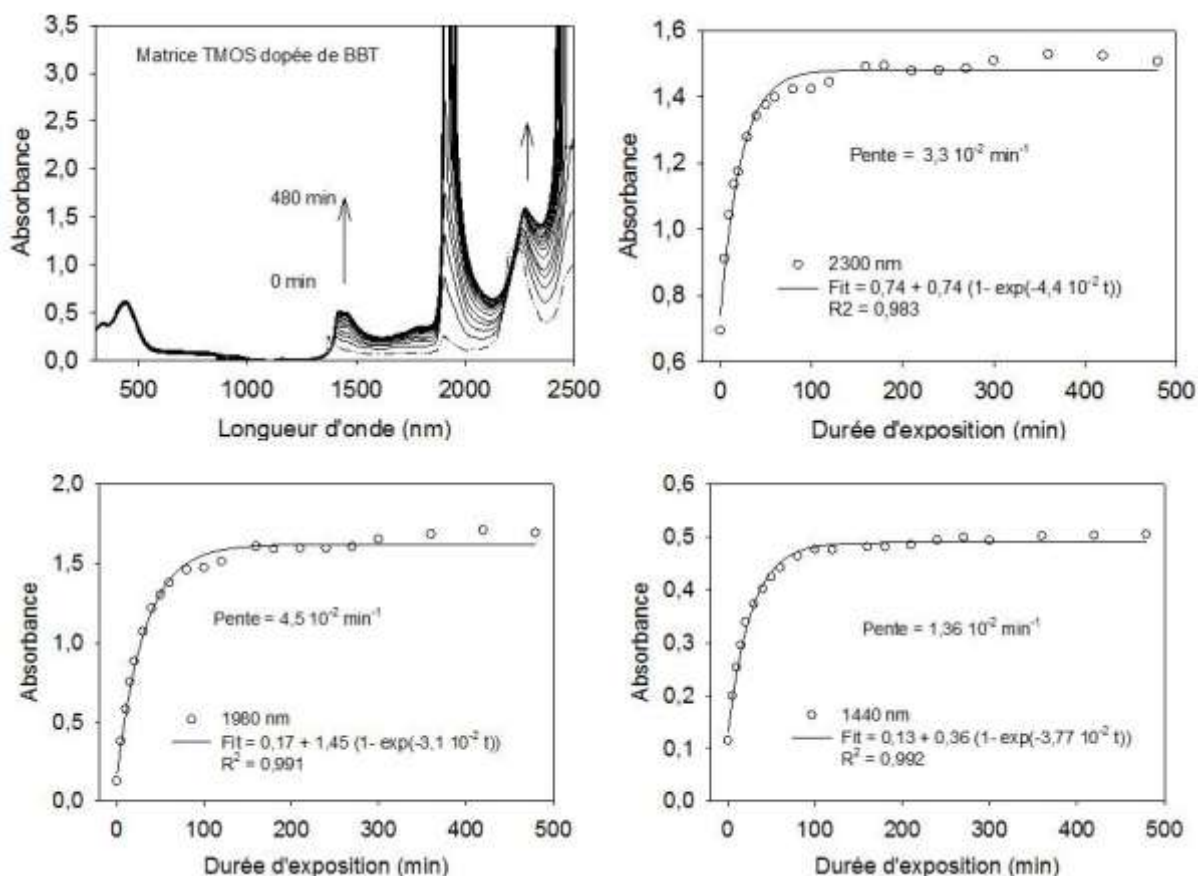


Figure 74. Variation spectrale de la matrice TMOS dopée de BBT ($2,7 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$) au cours de son exposition à de la vapeur d'eau saturante et suivi de l'absorbance à 2300, 1980 et 1450 nm en fonction du temps.

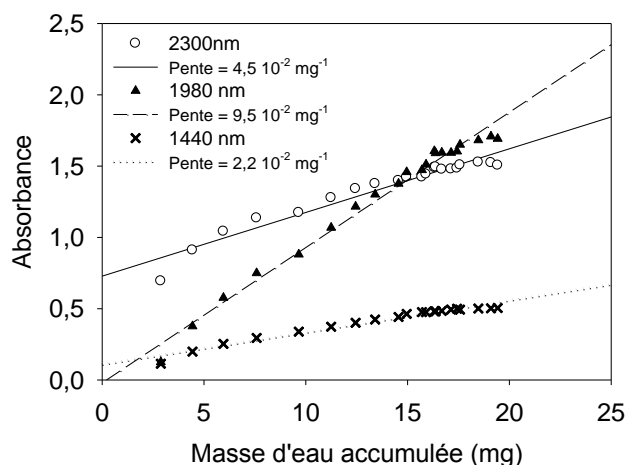


Figure 75. Evolution des intensités des bandes vibrationnelles des SiOH liés aux agrégats d'eau en fonction de la masse d'eau accumulée.

La Figure 76 montre l'évolution spectrale du BBT piégé dans les pores de la matrice en fonction de la durée d'exposition de la matrice à de la vapeur d'eau.

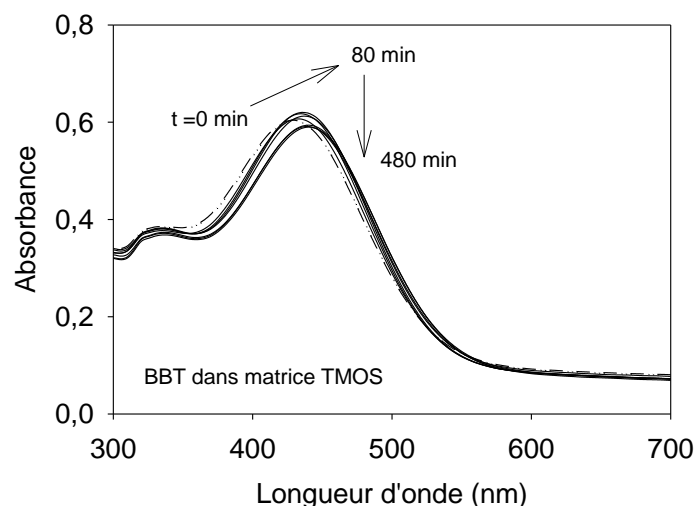


Figure 76. Evolution spectrale du BBT $2,7 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ en fonction du temps lors de l'exposition de la matrice de TMOS à de la vapeur d'eau. Le spectre en pointillé correspond au temps $t = 0$.

On observe dès les cinq premières minutes un déplacement bathochrome, de 430 à 435 nm, de la forme acide du BBT accompagnée d'une légère augmentation de l'absorbance qui se poursuit jusqu'à 80 min. A partir de $t = 80$ min, on observe en même temps que le déplacement bathochrome une légère diminution de l'intensité de la bande d'absorption. De 80 à 480 min, l'intensité de la bande d'absorption et la position du maximum située à 440 nm demeurent inchangées. On n'observe pas la présence de BBT base.

Les résultats observés sont rationalisés de la manière suivante. Le déplacement bathochrome du maximum d'absorption est attribué à la solvatisation du BBT par les molécules d'eau. A $t = 80$ min, la concentration d'eau est de $\sim 9,9 \text{ mol.L}^{-1}$. Cette concentration d'eau est largement suffisante pour solvater les molécules de BBT et pour déprotoner les groupements silanol résiduels. La présence des groupements Si-OH résiduels, n'ayant pas condensé pour former les liaisons siloxanes, confère à la matrice une certaine acidité. Le nombre de groupements résiduels SiOH avait été déterminé dans le passé au laboratoire avec des expériences en RMN du silicium ^{29}Si . A partir des données existantes sur les matrices à base de TMOS et de MeTMOS/TMOS [10], nous pouvons estimer une concentration de groupements Si-OH. Ainsi, la concentration de groupements silanol dans la matrice est estimée $2,6 \text{ mol.L}^{-1}$, en tenant compte de la concentration de TMOS dans le sol ($4,53 \text{ mol.L}^{-1}$), du facteur de contraction volumique (3,88) lorsqu'on passe de la solution à la matrice finale et du pourcentage de groupements Si-OH n'ayant pas condensé ($\sim 15\%$). L'absence de la forme basique du BBT est l'indication que le pH intrapore est acide et que sa valeur doit être inférieure à 4,65. En effet, à pH égal à 4,65, la concentration de la forme acide est 280 fois supérieure à celle de la forme basique et on n'observe pas cette dernière (voir Figure 65). L'acidité du pH intrapore est due à la présence de protons provenant du transfert de proton des groupements silanol à l'eau intrapore. Ce résultat nous permet d'estimer le pK_a des groupements silanol. Celui-ci devrait être inférieur à celui du BBT ($\text{pK}_a = 7,1$) pour pouvoir acidifier l'eau intrapore et empêcher la déprotonation du BBT acide.

La mesure du pK_a des groupements silanol a fait l'objet de nombreux travaux dans la littérature avec des résultats souvent controversés. La première valeur déterminée par Schindler et al. [11] par titrage de la silice amorphe est de 6,8. Cette valeur a été remise en cause par la suite par Allen et al. qui trouvent une valeur plus faible entre 4 et 5,5 [12]. D'autres valeurs de pK_a ont été par

la suite déterminées dans les années 90 avec les expériences de mesure de dissociation de molécules d'acide à l'interface eau/quartz en utilisant les techniques spectroscopiques de génération du second harmonique par somme de fréquences. Le groupe d'Eisenthal [13] a ainsi montré que les surfaces de silice fondue présentent deux types d'acidité avec deux valeurs de pK_a de 4,9 et de 8,5 avec des proportions respectives de 19% et de 81%. Leurs résultats ont été confirmés par un autre groupe utilisant la même technique. Ce dernier suggère que l'acidité faible est due aux groupements silanol qui font des liaisons-H fortes avec les molécules d'eau. Ces auteurs s'accordent à attribuer ces deux acidités à deux types de groupements silanol : le premier serait composé de Si-OH directement liés par liaison-H à un autre Si-OH alors que le second correspondrait aux groupements silanol isolés. La déprotonation et le transfert du proton à l'eau serait plus difficile pour les premiers et facilitée pour les seconds. Plusieurs groupes trouvent des résultats plus qualitatifs allant cependant dans le même sens en utilisant d'autres techniques comme la microscopie de fluorescence [14] [15]. Plus récemment, des chercheurs remettent en cause cette interprétation en déterminant l'énergie libre de déprotonation de groupements silanol de différentes structures sur des surfaces cristallines de silice, en utilisant des techniques de calcul ab-initio de dynamique moléculaire [16]. D'après leurs résultats, ce seraient les groupements silanol isolés sur une surface hydrophobe constituée de cycles de trimères $(SiO)_3$, qui présenteraient une faible valeur de pK_a comprise entre 3,8 et 5,1. Les autres types de silanol isolés ou liés par liaison-H entre eux sur d'autres surfaces hydroxylés présentent en revanche des valeurs de pK_a plus élevées entre 7 et 8,9.

Sur la base de nos résultats, nous pouvons rejeter l'hypothèse de l'existence dans la matrice de TMOS de groupements silanol possédant un pK_a égal ou supérieur à celui du BBT ($7,1 \pm 0,2$). En effet, l'absence d'équilibre acido-basique pour le BBT implique que les groupements silanol sont plus acides que le BBT et que leur pK_a est donc plus faible. Ainsi, la déprotonation des groupements SiOH va libérer des protons et acidifier le pH intrapore et empêcher la déprotonation du BBT. Etant donnée la forte concentration de SiOH résiduels dans la matrice, la déprotonation d'une infime partie des groupements silanol contribuera aisément à l'obtention d'un pH intrapore de 4,65. Le Tableau 24 regroupe le calcul des concentrations de SiO^- ou de protons pour l'obtention d'un pH intrapore de 4,65, en supposant différentes valeurs de pK_a de SiOH entre 4,5 et 6.

Tableau 24 : estimation de la concentration de protons en fonction des valeurs de pK_a des groupements SiOH

pK_a (SiOH)	$[H^+]$ (mol.L ⁻¹)
6,0	0,11
5,5	0,32
5,0	0,80
4,5	1,52

L'apport de l'eau est nécessaire pour l'établissement de cet équilibre acido-basique. A $t = 80$ min, la concentration d'eau mesurée dans la matrice est de $9,9 \text{ mol.L}^{-1}$. Cette concentration de molécules d'eau doit être suffisamment élevée pour contribuer à la fois à la solvataion du BBT, à l'équilibre acido-basique des groupements silanol et à la solvataion des espèces chargées issues de cet équilibre. Les molécules d'eau peuvent également se trouver dans des pores vides ou dans des pores contenant une molécule de BBT. D'ores et déjà, la valeur de 4,5 du pK_a semble faible au regard de la concentration d'eau nécessaire pour la solvataion des SiO^- , des protons et du BBT. Les études

avec les matrices hybrides vont apporter des renseignements supplémentaires pour une estimation du pK_a des silanols.

IV.1.2 Exposition d'une matrice vierge TMOS/APTES 97/3 à de la vapeur d'eau

La deuxième expérience est réalisée avec une matrice vierge de TMOS/APTES 97/3 de $0,043 \text{ cm}^3$ de volume, conservée après synthèse sous atmosphère sèche dans un dessiccateur. La Figure 77 montre la masse d'eau accumulée dans la matrice dès sa sortie du dessiccateur et au cours d'une exposition de 512 min. La masse d'eau initialement piégée avant exposition est donnée par la courbe de fit au temps t égal à zéro. Elle est de $0,78 \text{ mg}$. Le monolithe sec pèserait donc $47,52 \text{ mg}$.

La courbe atteint un plateau autour de 300 min et la masse d'eau accumulée, de $22,48 \text{ mg}$ correspond à $47,3 \%$ de la masse initiale de la matrice sèche. Le volume poreux ainsi déterminé est de $0,473 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$. Cette valeur est très proche de celle obtenue porosimétrie ($0,48 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$), avec l'établissement d'isothermes d'adsorption et de désorption de l'azote à la température de l'azote liquide. La vitesse d'adsorption de la vapeur d'eau pour la matrice vierge de TMOS/APTES 97/3 est de $0,252 \text{ mg} \cdot \text{min}^{-1}$ (Figure 77, gauche). Il est important de noter que la concentration d'eau dans les pores augmente vite, bien que plus lentement que la matrice TMOS, et qu'elle atteint pratiquement $29 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ en 300 minutes lorsque la matrice est saturée d'eau (Figure 77, droite).

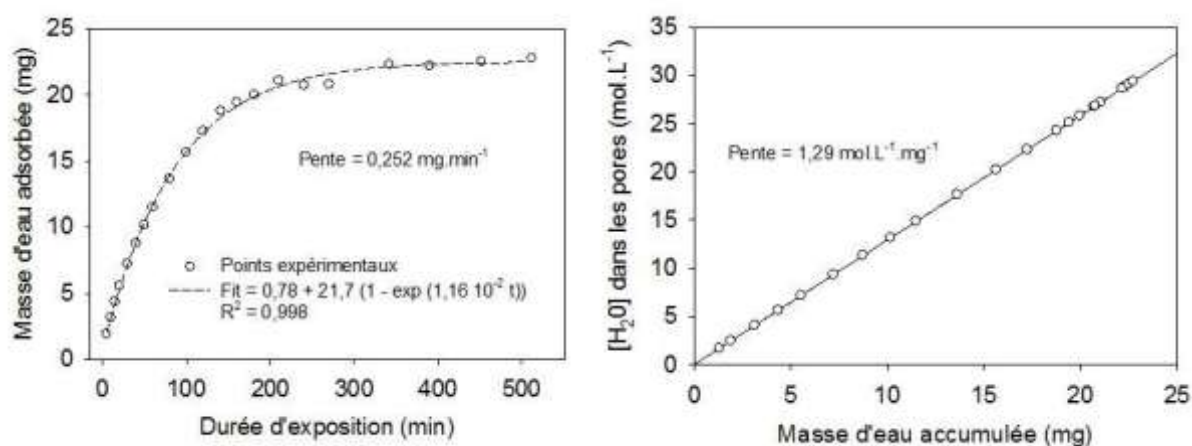


Figure 77. Gauche : Masse d'eau accumulée dans une matrice TMOS/APTES 97/3 vierge en fonction de la durée d'exposition à de la vapeur saturante d'eau, Droite : Concentration d'eau dans les pores en fonction de la masse d'eau accumulée au cours du temps

Les spectres d'absorption UV-visible et proche-IR collectés au cours de l'exposition sont montrés dans la Figure 78. La présence d'une grande quantité d'eau dans les pores est corroborée avec le suivi du spectre proche-IR du monolithe au cours de l'exposition à la vapeur d'eau saturante (Figure 78). L'évolution des absorbances des bandes d'absorption de SiOH en fonction du temps est moins rapide dans la matrice hybride que dans celle du TMOS car la proportion de groupements SiOH résiduels est plus faible.

L'évolution des intensités des transitions vibrationnelles à 1440 , 2005 et 2300 nm en fonction de la quantité d'eau piégée dans le monolithe TMOS/APTES 97/3 est montrée dans la Figure 79. On observe une évolution quasi linéaire de l'intensité des absorptions à 1440 , 1980 et 2300 nm en fonction de la masse d'eau accumulée dans la matrice. Les vitesses correspondantes mesurées sont plus faibles que celles obtenues pour la matrice de TMOS, cette dernière étant plus hydrophile. Ces

droites peuvent servir de courbe de calibration pour quantifier la quantité d'eau piégée dans une matrice TMOS/APTES 97/3, avec uniquement l'acquisition d'un spectre proche IR.

La présence des groupements Si-OH résiduels, n'ayant pas condensé pour former les liaisons siloxanes, confère à la matrice une certaine acidité. A partir des données existantes sur les matrices à base de TMOS et de MeTMOS/TMOS [17], nous pouvons de nouveau estimer une concentration de groupements SiOH. Ainsi, si le degré de condensation est voisin de 85%, la concentration des groupements silanol résiduels serait de $1,37 \text{ mol.L}^{-1}$ dans la matrice finale, soit pratiquement 2 fois moins que pour la matrice de TMOS. La concentration de groupements aminopropyle provenant de l'APTES, qui confère à la matrice une certaine hydrophobicité et basicité est connue. La concentration de l'APTES, de $0,07 \text{ mol.L}^{-1}$, dans le sol devient après la synérèse $0,47 \text{ mol.L}^{-1}$ dans la matrice finale¹⁰. Les groupements aminopropyle peuvent être solvatés et protonés en présence d'eau, lorsque la quantité de cette dernière est suffisamment élevée dans les pores pour pouvoir stabiliser les espèces chargées. En effet, le pKa de l'APTES protoné, égal à 10, correspond à celui des amines primaires aliphatiques protonés qui est de 10,6 [18]. On peut prévoir d'ores et déjà l'existence de trois équilibres acido-basiques dans les matrices hybrides TMOS/APTES dopées de BBT dont celui du BBT et ceux des groupements silanol et APTES dans les matrices hybrides dopées de BBT.

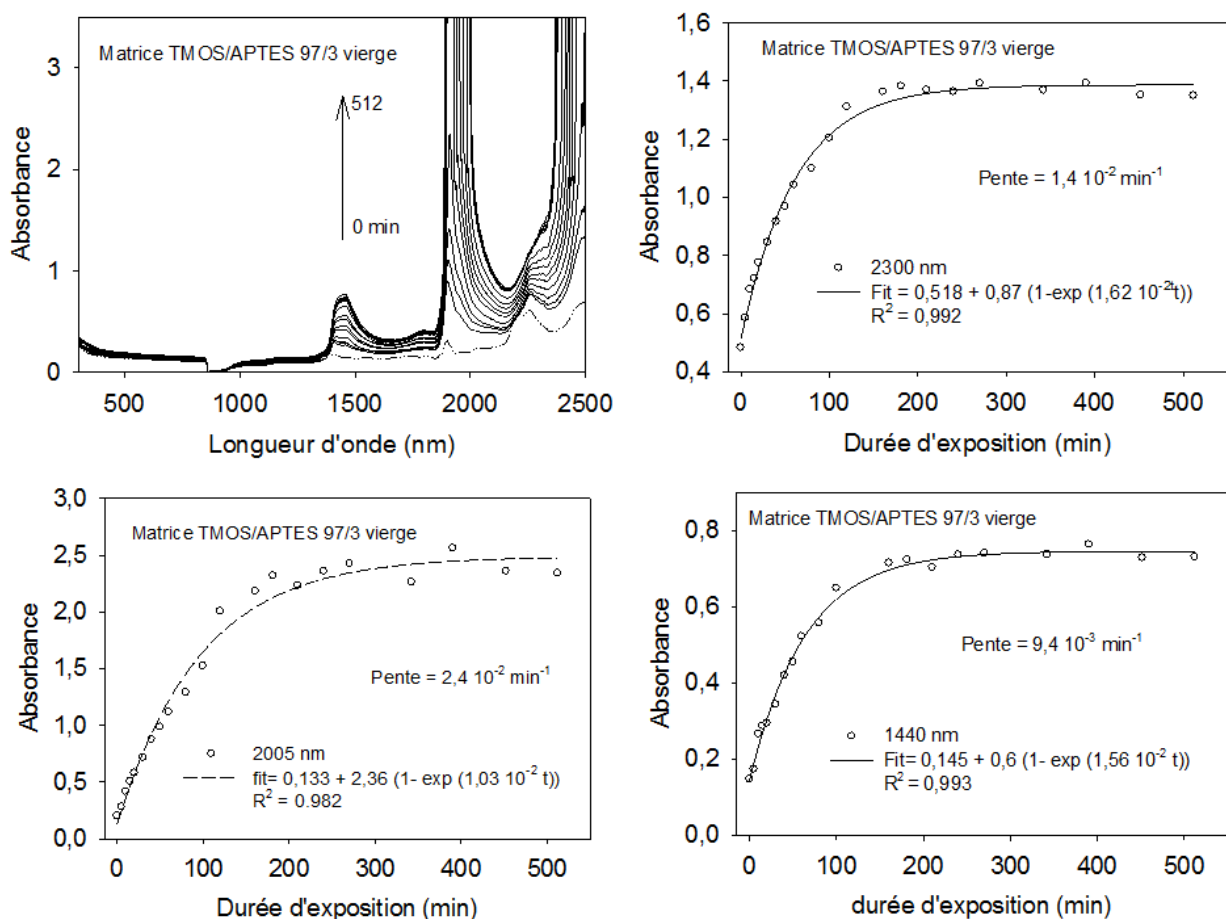


Figure 78. Variation spectrale de la matrice vierge TMOS/APTES 97/3 au cours de son exposition à de la vapeur d'eau saturante et suivi de l'absorbance à 2300, 2005 (bande 1980 trop intense) et 1450 nm en fonction du temps.

¹⁰ Facteur de rétrécissement après synérèse = 6,78

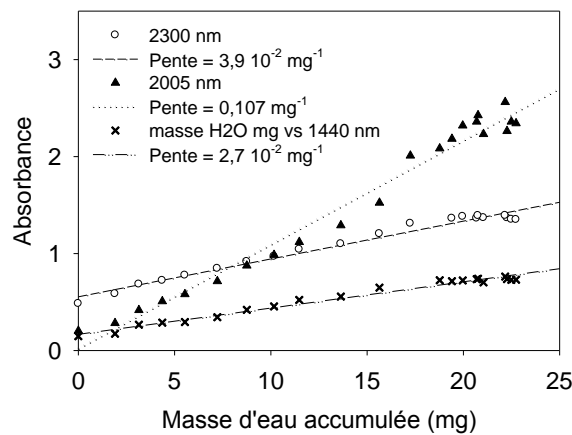


Figure 79. Evolution des intensités des bandes vibrationnelles des SiOH liés aux agrégats d'eau dans une matrice TMOS/APTES 97/3 vierge

IV.1.3 Exposition d'une matrice TMOS/APTES 97/3 dopée de BBT à de la vapeur d'eau

Les mêmes expériences sont répétées avec une matrice TMOS/APTES 97/3 de $0,047 \text{ cm}^3$ de volume, dopée de bleu du bromothymol, un colorant sensible au pH et dont le pK_a est égal à 7,1. L'objectif est de connaître le pH intrapore en fonction de la quantité de chaînes aminopropyle dans la matrice et de la quantité d'eau présente dans les pores.

La Figure 80 montre l'évolution de la masse d'eau accumulée au cours de l'exposition. La matrice est saturée au bout d'environ 350 min. L'adsorption d'eau suit une loi de croissance exponentielle à plateau. La valeur au plateau correspond à la masse maximale d'eau adsorbée à partir de laquelle est déduit le volume poreux de la matrice. La matrice contient initialement de l'eau, dont la quantité peut être déduite de la courbe. Elle est égale à 1,25 mg. En tenant compte de cette masse d'eau, la matrice sèche pèse alors 48,75 mg. La vitesse d'adsorption d'eau, de $0,238 \text{ mg}\cdot\text{min}^{-1}$, est légèrement plus faible que celle de la même matrice non dopée ($0,252 \text{ mg}\cdot\text{min}^{-1}$). En revanche, la masse d'eau atteinte lorsque la matrice est saturée est plus élevée, de 26,25 mg, soit 53,8% de son poids initial. Cette différence est due au volume poreux ($0,538 \text{ cm}^3\cdot\text{g}^{-1}$) de la matrice dopée qui est plus élevé que celui de la matrice neutre, du fait de la présence des molécules de BBT qui élargissent la distribution de tailles de pores.

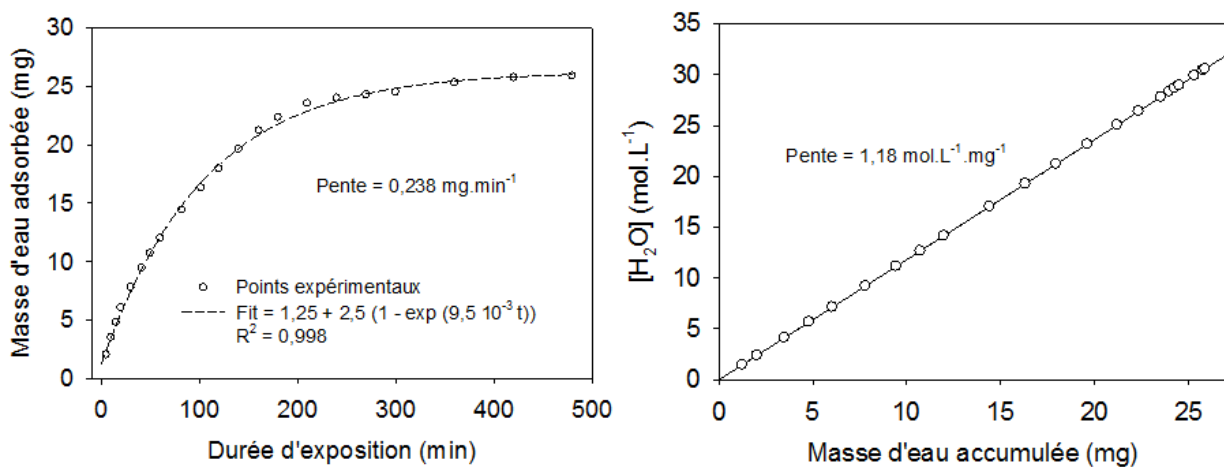


Figure 80. Gauche : Masse d'eau accumulée dans une matrice TMOS/APTES 97/3 de $0,047 \text{ cm}^3$ de volume dopée de BBT $1,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ en fonction de la durée d'exposition à de la vapeur saturante d'eau, droite : Concentration d'eau dans les pores en fonction de la masse d'eau accumulée au cours du temps

Les spectres d'absorption dans le proche IR collectés au cours de l'exposition témoignent de l'adsorption d'eau dans la matrice au cours du temps. L'évolution des intensités des transitions vibrationnelles à 1440, 2035 et 2300 en fonction de la durée d'exposition et de la quantité d'eau piégée dans le monolithe TMOS/APTES 97/3 est montrée dans la Figure 81.

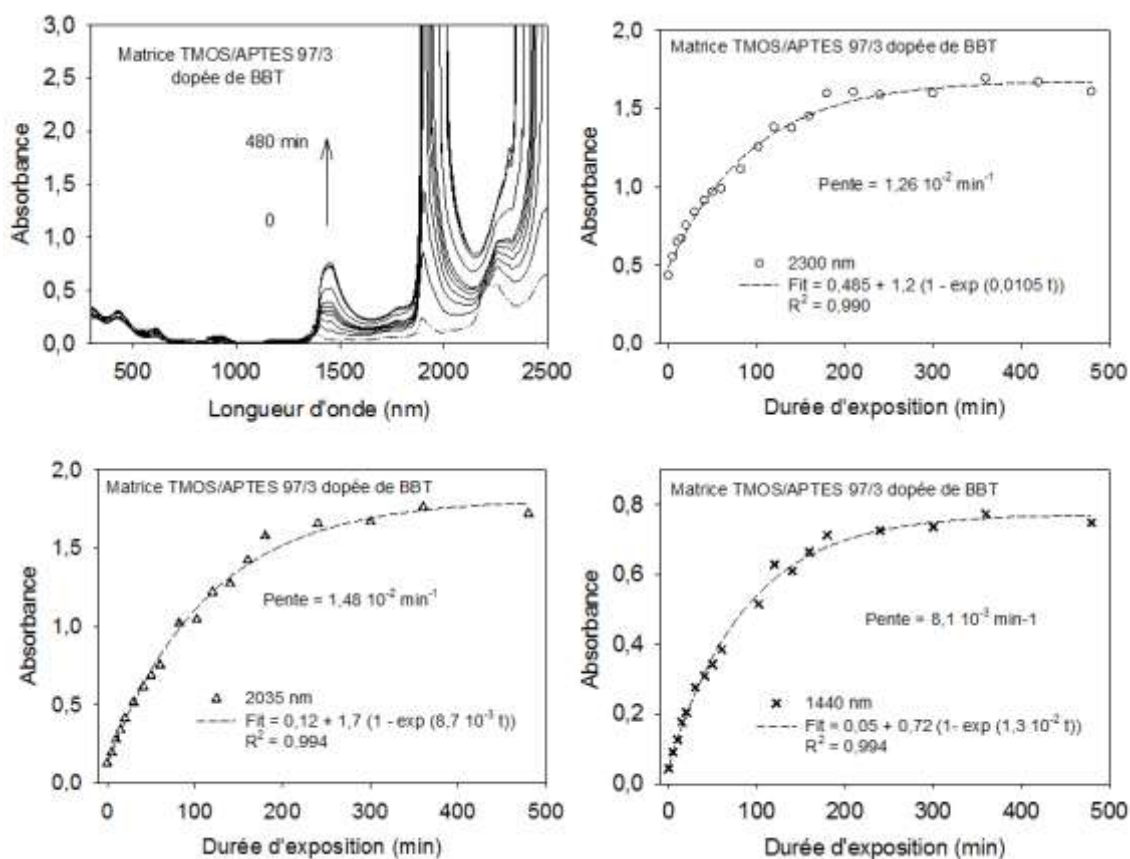


Figure 81. Variation spectrale de la matrice TMOS/APTES 97/3 dopée de BBT $1,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ au cours de son exposition à de la vapeur d'eau saturante et suivi de l'absorbance à 2300, 2035 (bande 1980 trop intense) et 1450 nm en fonction du temps.

On observe une bonne corrélation entre l'augmentation des intensités des absorbances et la vitesse d'adsorption d'eau de la matrice. Les variations d'absorbance à 2300, 2035 et 1440 nm en fonction de la masse d'eau accumulée sont plus faibles que celles observées dans le monolithe vierge. Ce résultat n'est pas surprenant car une grande quantité d'eau doit être impliquée dans la solvation du BBT, comme nous le verrons par la suite. Le Tableau 25 regroupe les données relatives aux deux systèmes vierge et dopé de BBT.

Tableau 25 : Comparaison des propriétés des deux matrices TMOS/APTES 97/3 vierge et dopée de BBT $1,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$

Système	H ₂ O total mg	V _{ads} (H ₂ O) mg.min ⁻¹	V _{poreux} cm ³ .g ⁻¹	V _{abs} (2300 nm) mg ⁻¹	V _{abs} (1440 nm) mg ⁻¹
Matrice vierge	22,48	0,252	0,473	$3,9 \cdot 10^{-2}$	$2,7 \cdot 10^{-2}$
Matrice dopée de BBT	26,25	0,238	0,538	$1,26 \cdot 10^{-2}$	$0,81 \cdot 10^{-2}$

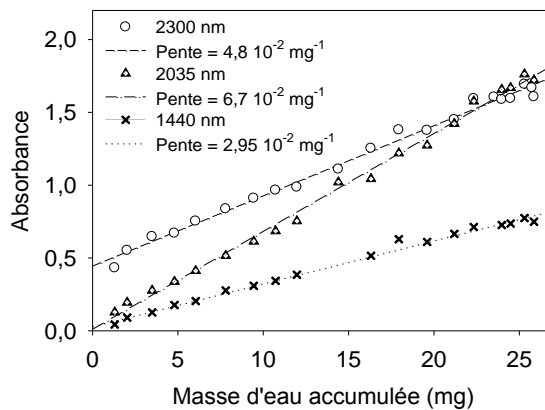


Figure 82. Evolution des intensités des bandes vibrationnelles des SiOH liés aux agrégats d'eau dans une matrice TMOS/APTES 97/3 dopée de BBT $1,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$.

Des courbes de calibration peuvent être établies pour quantifier la quantité d'eau adsorbée dans la matrice à partir de la mesure des intensités d'absorbances de bandes d'absorption dans le proche-IR (Figure 81). Comparativement à la matrice vierge, on observe une solvataion plus lente des groupements Si-OH résiduels en fonction de la quantité d'eau adsorbée. Ce résultat n'est pas surprenant car une partie des molécules d'eau solvate le BBT en induisant l'équilibre acido-basique et solvate les groupements aminopropyle protonés de l'APTES, comme nous le verrons par la suite.

La Figure 83 montre l'évolution des bandes d'absorption UV-visibles du BBT lors de l'accumulation d'eau dans la matrice. Le spectre initial présente les deux bandes associées aux formes acide et basique du BBT. La présence des deux espèces indique qu'il y a suffisamment d'eau dans les pores pour solvater les deux espèces et établir un équilibre acido-basique. En effet, à $t=0$, la concentration d'eau dans les pores est de $1,5 \text{ mol.L}^{-1}$. Rappelons que la concentration dans la matrice des groupements aminopropyle est de $0,47 \text{ mol.L}^{-1}$ et que celle des groupements silanol est de $1,37 \text{ mol.L}^{-1}$. Cette quantité d'eau n'est pas suffisante pour à la fois solvater le BBT et stabiliser les espèces chargées issues de la déprotonation des groupements silanol et de la protonation des fonctions amines de l'APTES.

Dans les dix premières minutes d'exposition de la matrice, on observe une diminution de l'intensité de la bande correspondant à la forme acide au profit de celle de la forme basique. A $t=10$ min, la concentration d'eau dans les pores a augmenté et est devenue $2,4 \text{ mol.L}^{-1}$. Cet équilibre est déplacé graduellement vers la forme basique qui est stabilisée en présence d'eau et la présence d'un point isobestique à 498 nm témoigne de cette transformation.

Au-delà de 10 min et pendant les prochaines minutes jusqu'à 180 min, on observe un phénomène inverse, soit une diminution graduelle du BBT basique au profit du BBT acide. Entre 15 et 180 min, la concentration d'eau dans les pores a augmenté de $4,1$ à $25,0 \text{ mol.L}^{-1}$. L'eau est maintenant en quantité suffisante pour à la fois stabiliser les espèces chargées et protoner les groupements amines en induisant un changement progressif du pH intrapore. Lorsque la concentration d'eau atteint $25,0 \text{ mol.L}^{-1}$, on observe une légère ré-augmentation de la forme basique et l'équilibre acido-basique devient stable à partir de 300 min lorsque la saturation est atteinte. Nous attribuons cet effet à la diffusion des molécules d'eau dans le réseau poreux constitué de pores vierges et de pores contenant une molécule de BBT, avant la saturation complète des pores. Les équilibres acido-basiques des groupements silanol et APTES sont alors établis.

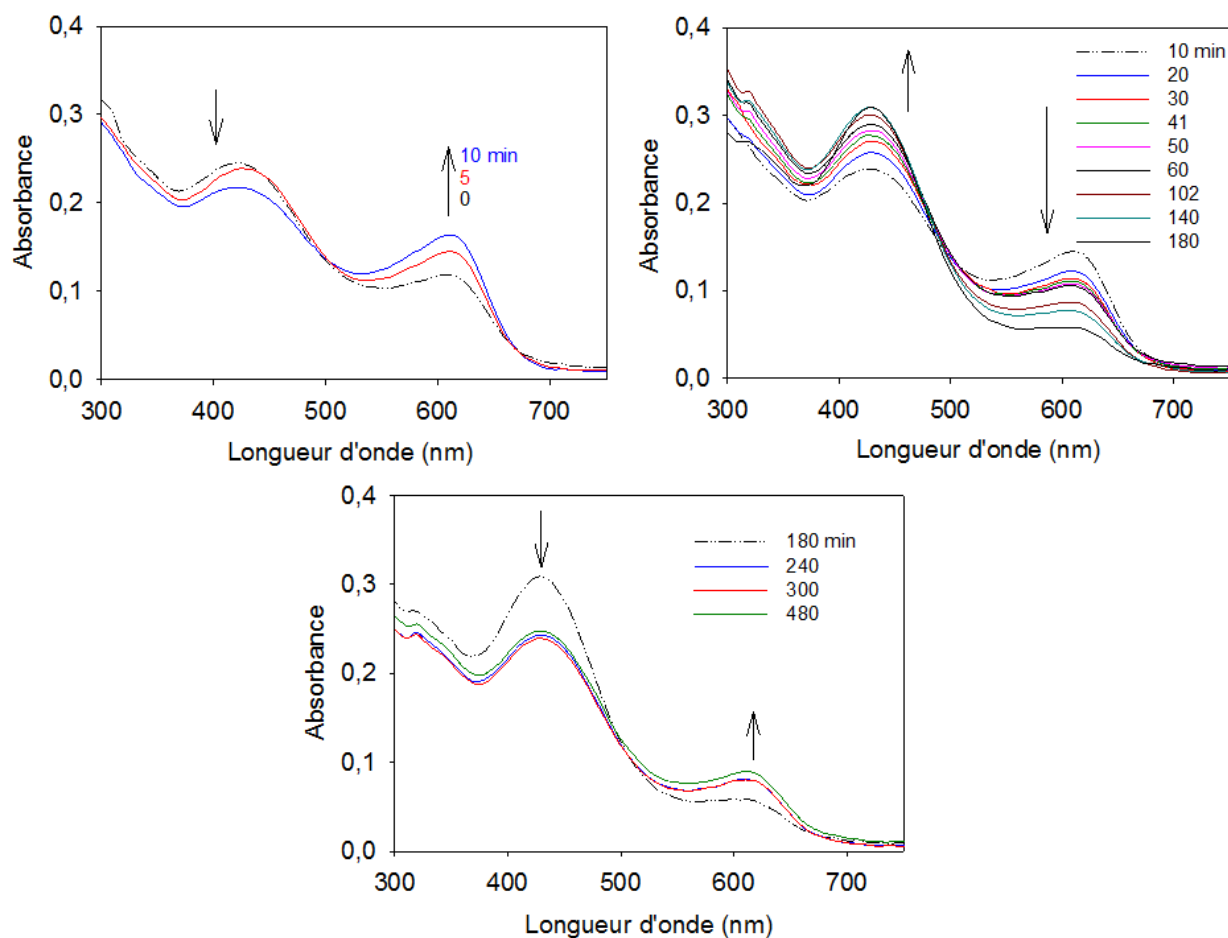


Figure 83. Evolution des bandes d'absorption des formes acide et basique du BBT $1,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ dans la matrice TMOS/APTES 97/3 lors de son exposition à de la vapeur d'eau saturante. La courbe en pointillé dans chaque figure correspond à l'instant initial.

Pour corrélérer la quantité d'eau adsorbée au pH intrapore, il faut déterminer les valeurs de ce dernier à différentes durées d'exposition. Pour quantifier la proportion de BBT acide et basique, il est nécessaire de reconvoluer les spectres du mélange des deux espèces. Les spectres d'absorption du BBT en solution et dans une matrice poreuse de silicate peuvent différer du fait de l'interaction du BBT avec un environnement différent. Les études antérieures du laboratoire ont montré un élargissement des bandes d'absorption, notamment pour les composés présentant des bandes vibrationnelles très fines comme les composés aromatiques monocycliques (Benzène, toluène, xylènes). Ce phénomène devrait être minimisé avec le BBT qui possède des bandes d'absorption larges dépourvues de structure fine. La Figure 84 montre les spectres d'absorption des formes acides et basiques du BBT en solution et dans des monolithes, normalisés au maximum d'absorption correspondant.

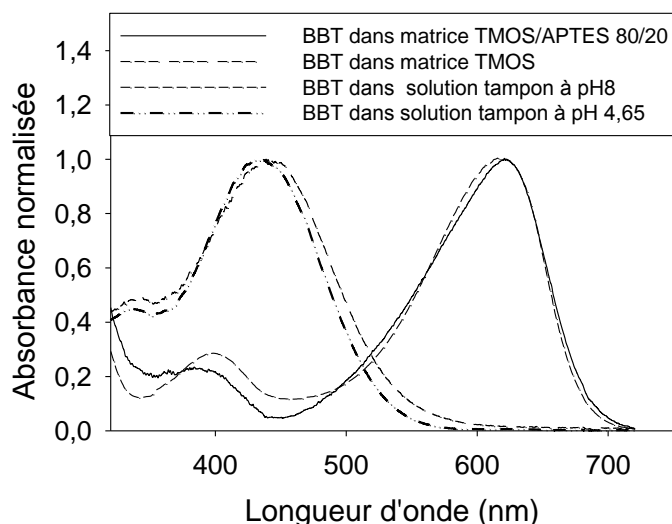


Figure 84. Comparaison des spectres d'absorption des formes acides et basiques du BBT en solution aqueuse et dans une matrice poreuse.

Une matrice de TMOS et une matrice de TMOS/APTES 80/20 ont été utilisés pour l'obtention des formes pures acide et basique du BBT dans une matrice poreuse. On observe un léger déplacement bathochrome du maximum d'absorption de la bande correspondant au BBT acide dans le TMOS par rapport à celui obtenu en solution. Il en est de même pour le spectre de la forme basique pour la transition de plus basse énergie. On observe en revanche un déplacement hypsochrome de la transition à plus haute énergie pour la forme basique, qui apparaît plus sensible à la polarité du milieu. Ce point est important à noter comme nous le verrons par la suite avec les évolutions spectrales en fonction de la quantité d'eau adsorbée dans la matrice TMOS/APTES 80/20.

Les différences de propriétés optiques du BBT acide et base en solution et dans les matrices étant minimales, pour la reconvolution spectrale et l'évaluation de la proportion de chaque espèce, nous avons pris les mêmes coefficients d'extinction molaire du BBT pour les formes acide et base en solution et tenu compte de l'épaisseur de la matrice après synerèse ¹¹. La Figure 85 montre ces reconvolutions spectrales.

En prenant les valeurs des coefficients d'extinction molaire des espèces acides et basiques du BBT en solution et en tenant compte de l'épaisseur de la matrice, les concentrations d'espèces acides et basiques ont été calculées. Le pH dans la matrice initiale avant et après exposition à de la vapeur d'eau est déterminé à partir de l'équation:

$$pH = pK_a - \log \frac{[acide]}{[base]}$$

Avec $pK_a(\text{BBT}) = 7,1$ en solution

¹¹ En solution aqueuse acide tamponnée à pH=4.65, $\epsilon(433\text{nm}) = 16000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. En solution aqueuse tamponnée à pH 8, $\epsilon(616 \text{ nm}) = 33400 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Le BBT est uniquement sous la forme acide dans le monolithe de TMOS ($\lambda_{\text{max}}=438 \text{ nm}$, $\epsilon= 16000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) dont le facteur de rétrécissement est de 3,88 et dont l'épaisseur est de 1,1 mm. Le BBT est uniquement sous la forme basique dans la matrice TMOS/APTES 80/20 ($\lambda_{\text{max}}= 620 \text{ nm}$, $\epsilon= 33400 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) dont le facteur de rétrécissement est de 7,05 et dont l'épaisseur est de 1,07 mm. La matrice TMOS/APTES 97/3 a une épaisseur moyenne de 1,07 mm.

Toutes les données obtenues à partir des re-convolutions spectrales et de la pesée d'eau adsorbée sont regroupées dans le Tableau 26.

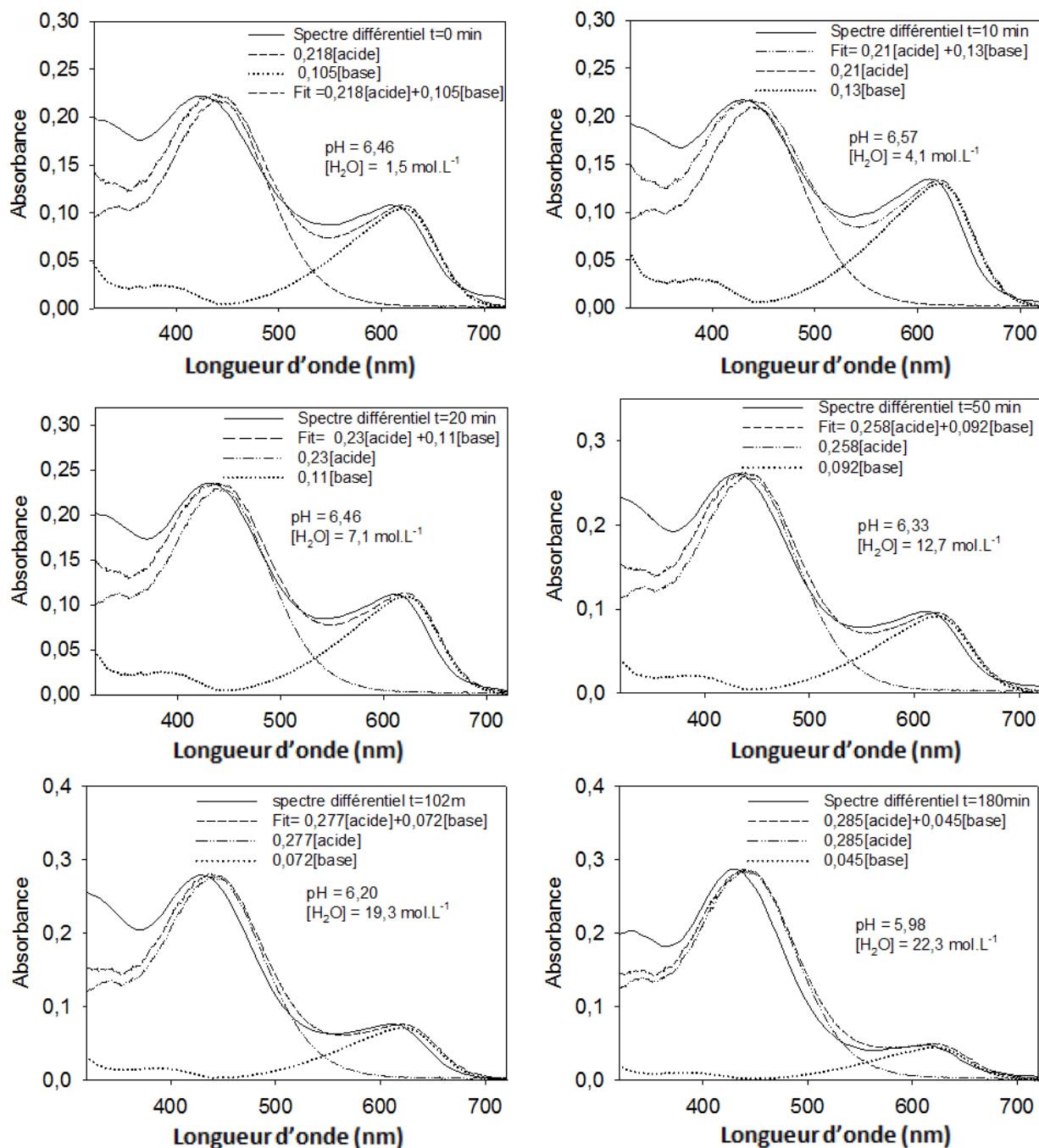


Figure 85. Comparaison des spectres d'absorption du mélange des formes acide et basique du BBT dans la matrice TMOS/APTES avant et après l'exposition à de la vapeur d'eau saturante avec le spectre reconstruit à partir des spectres de chaque espèce à t = 0, 10, 20, 50, 102 et 180 min. la reconvolution est faite à partir des spectres de la forme acide du BBT dans une matrice TMOS pure et de la forme basique du BBT dans une matrice TMOS/APTES 80/20.

Tableau 26 : Résultats issus de l'exposition statique de la matrice TMOS/APTES 97/3 dopée de BBT $1,7 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ à la vapeur saturante d'eau. Données obtenues à partir des re-convolutions spectrales et de la masse d'eau adsorbée par la matrice au cours de l'exposition

Durée exposition (min)	[BBT acide] mol.L^{-1}	[BBT base] mol.L^{-1}	C_{totale} mol.L^{-1}	pH	$[\text{H}_2\text{O}]$ mol.L^{-1}
0	$12,70 \cdot 10^{-5}$	$2,90 \cdot 10^{-5}$	$15,60 \cdot 10^{-5}$	6,46	1,5
10	$12,27 \cdot 10^{-5}$	$3,64 \cdot 10^{-5}$	$15,91 \cdot 10^{-5}$	6,57	4,1
20	$13,43 \cdot 10^{-5}$	$3,08 \cdot 10^{-5}$	$16,51 \cdot 10^{-5}$	6,46	7,1
50	$15,07 \cdot 10^{-5}$	$2,58 \cdot 10^{-5}$	$17,65 \cdot 10^{-5}$	6,33	12,7
102	$16,18 \cdot 10^{-5}$	$2,02 \cdot 10^{-5}$	$18,20 \cdot 10^{-5}$	6,20	19,3
180	$16,65 \cdot 10^{-5}$	$1,26 \cdot 10^{-5}$	$17,91 \cdot 10^{-5}$	5,98	22,3
480	$13,03 \cdot 10^{-5}$	$2,07 \cdot 10^{-5}$	$15,10 \cdot 10^{-5}$	6,30	25,0

$C_{\text{totale}} = [\text{BBT acide}] + [\text{BBT base}]$. Le volume de la matrice est de $0,047 \text{ cm}^3$ et celui des pores de $0,0262 \text{ cm}^3$.

Ainsi, dans les premières minutes alors que la quantité d'eau piégée est encore faible, les molécules d'eau solvant en premier le BBT, les groupements SiOH et Amino de l'APTES, mais la proportion de groupements SiOH ayant perdu un proton reste relativement faible. Le pH intrapore est alors estimé à 6,46 à partir des concentrations calculées des formes acide et basique du BBT. Entre $t=10$ et $t=180$ min, le pH intrapore a graduellement diminué de 0,59 unités (Figure 86). La grande quantité d'eau adsorbée a augmenté et a contribué à la déprotonation des groupements silanol et à la protonation des groupements amine présents à une concentration $0,47 \text{ mol.L}^{-1}$ et à l'acidification du milieu.

Lorsque les pores sont complètement remplis, un nouvel équilibre est atteint avec un pH final de 6,3. A pH égal à 6,3, tous les groupements amino de l'APTES ($0,47 \text{ mol.L}^{-1}$) sont protonés et la concentration de protons présent dans l'eau intrapore est de $5 \cdot 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$. Avec l'hypothèse que les protons ayant protonés l'APTES proviennent des groupements silanol résiduels, il nous est à présent possible de d'estimer le pK_a de ces derniers.

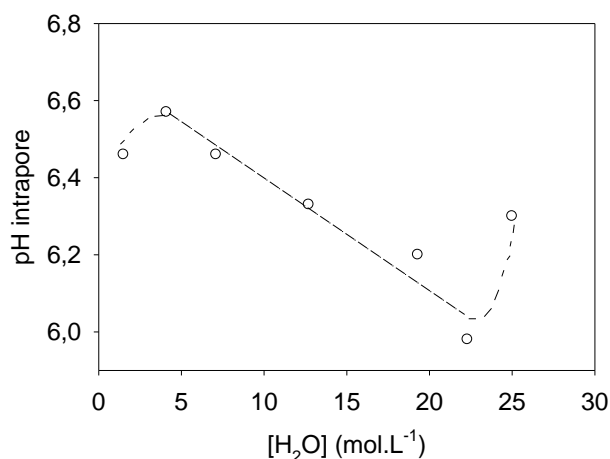


Figure 86. Variation du pH intrapore en fonction de la concentration d'eau présente dans les pores

$$K_a(\text{SiOH}) = \frac{[\text{SiO}^-][\text{H}^+]}{[\text{SiOH}]} = \frac{0,47 * 5 \cdot 10^{-7}}{1,37 - 0,47} = 2,61 \cdot 10^{-7}$$

$$pK_a(\text{SiOH}) = 6,58$$

Nous trouvons une valeur estimée similaire à celle obtenue par le groupe allemand [11] de $6,8 \pm 0,2$. A partir de la valeur du $pK_a(\text{SiOH})$, nous pouvons également estimer le rendement de

déprotonation des groupements résiduels SiOH dans la matrice TMOS. En supposant que le pH intrapore est de 4,65, valeur pour laquelle on n'observe que la forme acide, on obtient une concentration de SiO⁻ égale à $3 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$, soit seulement 1,15% de celle estimée pour les SiOH ($2,6 \text{ mol.L}^{-1}$).

Par ailleurs, un grand nombre de molécules est présent dans l'air ambiant, dont l'azote, l'oxygène et en particulier le CO₂ dont la concentration, de 400 ppm, est importante. Le CO₂ pourrait être rapidement solubilisé dans l'eau intrapore; le pH des solutions aqueuses non dégazées par exemple n'est jamais égal à 7, mais a des valeurs comprises entre 6,2 et 6,5. Une 2^{ème} hypothèse serait donc que l'augmentation d'acidité pourrait aussi être due à la dissolution de CO₂ qui se transforme en acide carbonique. Une telle éventualité est possible puisqu'à intervalles réguliers, la matrice est retirée de l'enceinte pour la collecte du spectre UV-visible et proche IR et pour une pesée. Ces opérations durent environ 10 min, pendant lesquelles la matrice est exposée à l'air ambiant. Cette seconde hypothèse sera examinée avec les études d'exposition en mode dynamique d'une matrice TMOS/APTES 97/3 dopée de BBT en absence et en présence de CO₂.

IV.2 Expositions dynamiques

IV.2.1 Dispositif d'exposition en dynamique

Le dispositif utilisé pour effectuer les expositions dynamiques au dioxyde carbone et à la vapeur d'eau est présenté dans la Figure 87.

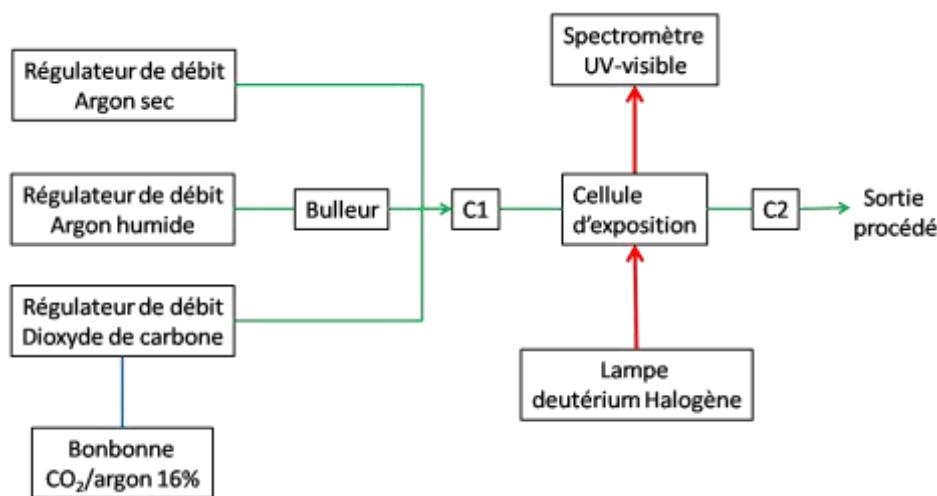


Figure 87. Représentation schématique du dispositif de génération de mélanges gazeux humides contenant du dioxyde de carbone. C1 et C2 sont les capteurs d'humidité en amont et en aval de la cellule d'exposition.

Les débits d'argon sec, de dioxyde de carbone et d'argon humidifié sont contrôlés par des régulateurs de débit massique Bronckhorst, calibrés pour fournir un débit maximal de 10 L.min^{-1} . L'argon de qualité 4,5 (Messer) est humidifié par passage dans un flacon bulleur de 1 L contenant 500 mL d'eau déminéralisée. Le dioxyde de carbone provient d'une bouteille contenant 16 % de dioxyde de carbone dilué dans l'argon (Messer). La mesure du taux d'humidité en amont et en aval de la cellule d'exposition est effectuée grâce à des capteurs d'humidité SHT-21 de marque Sensirion.

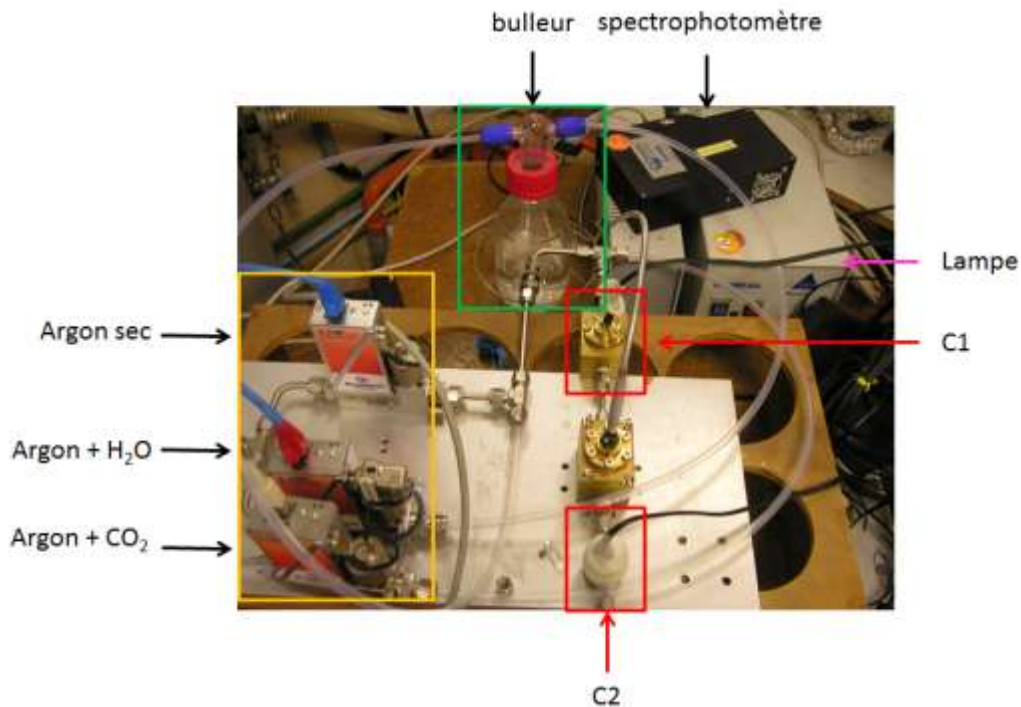


Figure 88. Photo du dispositif de génération de mélanges gazeux calibrés secs ou humides et du dispositif de mesure comprenant la cellule d'exposition, la source de lumière et le spectrophotomètre miniature.

La cellule d'exposition est constituée de deux blocs distincts en laiton : un bloc porte monolithe et un bloc de presse. Les deux blocs ont été usinés de manière à former un circuit d'écoulement de gaz une fois réunis. Le bloc presse s'emboîte dans le bloc porte-monolithe et l'étanchéité est assurée par un joint torique. L'écoulement du flux à l'intérieur de la cellule est assuré par des orifices rectangulaires de 2,5 mm de longueur et 2 mm de largeur. Les deux blocs sont percés dans leur épaisseur d'un orifice circulaire de 1 mm de diamètre pour le passage de la lumière. Les deux blocs sont reliés respectivement à la source de lumière et au spectrophotomètre via des fibres optiques. Des connecteurs SMA équipés de lentilles de 4,5 mm de diamètre permettent de focaliser le faisceau lumineux sur l'échantillon. Une fenêtre circulaire en quartz de 2 cm de diamètre et 1 mm d'épaisseur est compressée entre le bloc et le disque et l'étanchéité est assurée par des joints toriques.



Figure 89. Gauche : cellule d'exposition avec le bloc porte-monolithe et le bloc de presse. Droite : zoom sur le bloc porte-monolithe. L'orifice central sert de passage au faisceau lumineux pour la mesure d'absorbance du monolithe.

Les séries d'expériences programmées pour les expositions en mode dynamique vont nous permettre d'étayer ou de rejeter les hypothèses proposées pour expliquer les variations du pH intrapore. En effet, des expositions à de la vapeur d'eau sont réalisées en mode dynamique avec un flux d'argon humidifié par bullage dans de l'eau distillée en absence de CO₂, puis en présence de forte concentration de ce dernier. Plusieurs expériences sont réalisées avec des séquences différentes d'introduction du CO₂, dans un mélange gazeux sec suivi d'une humidification ou avec l'apport de CO₂ dans un mélange gazeux humide. Ces expériences ont pour but d'évaluer l'efficacité de piégeage du CO₂ « sec » ou « solvate » ou « dissous » dans la matrice et des effets induits sur le pH intrapore.

Notons que lorsque le mélange gazeux d'Ar contient 75% d'humidité et 40000 ppm de CO₂, chaque litre du mélange apporte 41,5 10⁻³ mole d'Ar¹², 1,66 10⁻³ mole de CO₂ (ou 40000 ppm) et 0,9 10⁻³ mole d'eau (ou 17000 ppm)¹³. Le flux du mélange gazeux est fixé à 1 L.min⁻¹ pour toutes les expériences.

IV.2.2 Evolution de l'équilibre acido-basique du BBT dans une matrice TMOS/APTES 97/3 exposée en mode dynamique à un flux d'Ar humide

Matrice TMOS/APTES 97/3 vierge

Dans cette expérience, la matrice est insérée dans un système fluide optimisé pour un piégeage efficace des composés volatils présents dans le mélange gazeux. Dans une 1^{ère} étape, une matrice vierge de TMOS/APTES 97/3 est exposée à un flux humide d'Ar (1L.min⁻¹, 75% HR) pendant 24 heures. Les spectres collectés sont montrés dans la Figure 90 (gauche). La matrice vierge humide servira de référence pour l'obtention des spectres différentiels lors de l'exposition de la même matrice dopée de BBT.

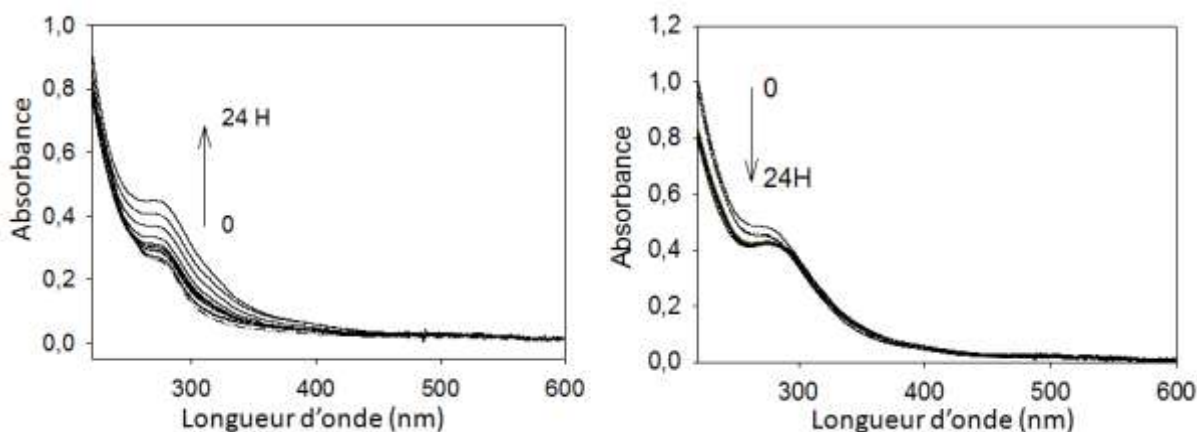


Figure 90. Evolution du spectre de la matrice vierge au cours du séchage de la matrice vierge TMOS/APTES 97/3 avec un flux d'Ar sec (1L.min⁻¹) (gauche), puis au cours de l'humidification de la matrice avec un flux d'Ar humide (1L.min⁻¹, HR=75%)(droite).

Pendant le séchage à l'Ar, on observe le piégeage d'une espèce absorbant dans l'UV, dont le maximum d'absorption se situe aux alentours de 280 nm. L'absorbance de l'espèce piégée augmentant avec la durée d'exposition, nous en déduisons qu'il s'agit d'une ou des impuretés

¹² Masse volumique de l'argon à 20°C = 1,66 10⁻³ g.cm⁻³

¹³ A 20°C, 100% d'humidité relative correspond à 17g d'eau par m³ d'air

présentes dans l'Ar de qualité 4,5. Lorsque la matrice est humidifiée dans une seconde étape, les impuretés restent piégées dans la matrice (Figure 90).

Matrice TMOS/APTES 97/3 dopée de BBT : série 1 d'exposition

Dans cette première expérience, la matrice dopée de BBT subit plusieurs cycles d'exposition en continu:

1. Exposition à un flux d'Ar sec ($1 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$) pendant 30 min
2. Exposition à un flux d'Ar sec ($1 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$) contenant du CO_2 (40000 ppm) pendant 30 min
3. Exposition à un flux d'Ar sec ($1 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$) pendant 30 min
4. Exposition à un flux d'Ar humide ($1 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$, HR=75%) pendant 60 min
5. Exposition à un flux d'Ar humide ($1 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$, HR=75%) contenant CO_2 (40000 ppm) pendant 60 min
6. Exposition à un flux d'Ar humide ($1 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$, HR=75%) pendant 60 min
7. Exposition à un flux d'Ar sec ($1 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$) pendant 30 min

Les spectres d'absorption UV-visible sont collectés toutes les 120 s. Le traitement de ces données est résumé dans la Figure 91. Les résultats obtenus sont rationalisés de la manière suivante. Comme il a été précédemment vu, le monolithe initial contient une certaine quantité d'eau. Celle-ci est en quantité suffisante pour l'établissement d'un pH intrapore et pour stabiliser les formes acide et base du BBT, dont on observe les bandes d'absorption spécifiques centrées respectivement à 438 et à 620 nm.

Lors du 1^{er} cycle d'exposition de la matrice à un flux d'Ar sec, la matrice se desséchant, l'espèce basique n'est plus stabilisée et l'équilibre acido-basique est déplacé vers la forme acide.

Lors de l'exposition au mélange Ar+ CO_2 sec, le dessèchement de la matrice se poursuit et on continue à observer la diminution de l'intensité de la bande de la base au profit de celle de la bande de l'acide. Un certain nombre de molécules de CO_2 ont pu être piégées dans la matrice au cours de cette exposition, mais la dissolution du CO_2 n'a pas lieu lorsque l'eau est en quantité insuffisante. Avec une nouvelle exposition à un flux d'Ar sec, le dessèchement de la matrice se poursuit mais beaucoup plus lentement, car il devient de plus en plus difficile d'enlever toutes les molécules d'eau interstitielles. Dans cette étape de dessèchement, on suppose que les molécules de CO_2 préalablement piégées sont partiellement ressorties de la matrice.

L'étape d'humidification de la matrice provoque d'importants changements. On observe une diminution brutale de la forme basique au profit de la forme acide du BBT. En 60 min, l'espèce basique a pratiquement disparu. Cette diminution brutale peut être reliée à la variation du pH intrapore due aux molécules d'eau présentes en grande quantité (HR=75%) et qui contribuent à déprotoner les fonctions silanol et à induire la protonation des groupements amines de l'APTES. La dissolution du CO_2 qui serait resté piégé partiellement pourrait également contribuer à cette acidification. Les concentrations des espèces présentes seront évaluées dans un 2^{ème} temps par reconvolution spectrale pour déterminer la variation du pH intrapore.

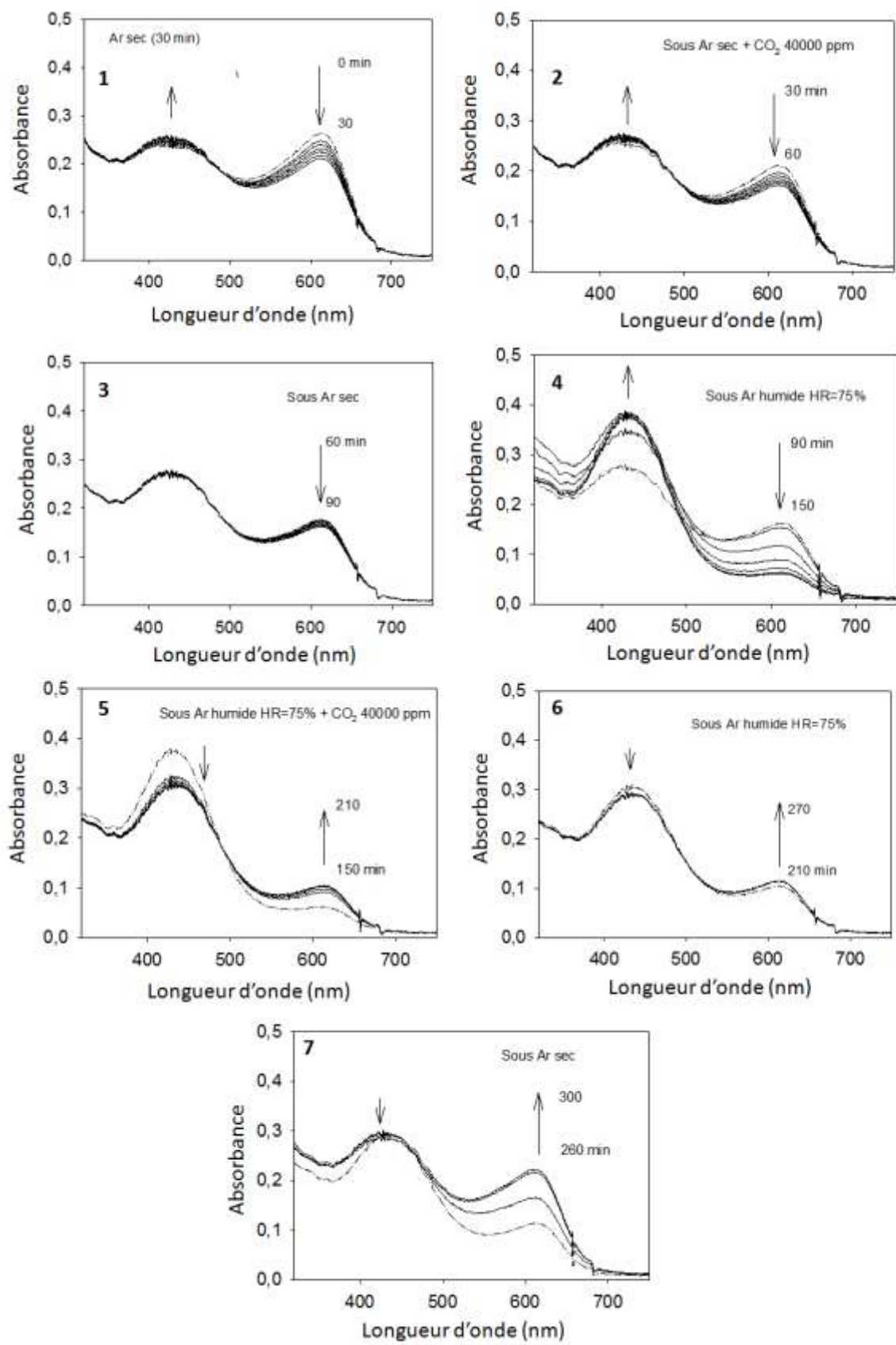


Figure 91 : Variations spectrales observées au cours des séquences d'exposition (1 à 7) de la matrice TMOS/APTES 97/3 dopée de BBT $1,9 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ à un flux d'Ar (1 L.min^{-1}) sec ou humide et contenant ou non du CO_2 (40000 ppm). La courbe en pointillé dans chaque figure correspond à l'instant initial.

L'apport de CO₂ supplémentaire dans un flux humide d'Ar dans le 5^{ème} cycle ne semble pas acidifier davantage l'eau intrapore. Dans cette étape, le flux apporte avec chaque litre de mélange gazeux 41,5 10⁻³ moles d'Ar, 1,66 10⁻³ moles de CO₂ et 0,9 10⁻³ moles d'eau. Il y a une compétition de piégeage entre les molécules d'Ar, de CO₂ et d'eau au profit de l'Ar et du CO₂ et la matrice se dessèche légèrement. Ce dessèchement contribue à diminuer la déprotonation des groupements SiOH et la protonation des groupements amines et à restaurer un pH plus basique, ce qui induit une ré-augmentation de la forme basique. Il y a trop peu d'eau dans les pores pour dissoudre le CO₂ dont la solubilité dans l'eau à 20°C est de 3,84 10⁻² mol.L⁻¹¹⁴. Un équilibre est atteint dans les pores, qui ne semble plus affecté lors de l'exposition de la matrice à un flux humide d'Ar dans le 6^{ème} cycle.

Avec un nouvel assèchement des pores avec un flux sec d'Ar dans le cycle N°7, on retrouve l'équilibre acido-basique du cycle N°1.

Les concentrations des espèces acides et basiques sont déterminées par reconvolution spectrale et le pH intrapore a été déduit pour chaque étape. Ces données sont résumées dans le Tableau 27.

Tableau 27. Données déduites des résultats de la série 1 d'exposition de la matrice TMOS/APTES 97/3 dopée de BBT 1,9 10⁻⁴ mol.L⁻¹

Etape	Durée exposition (min)	[BBT acide] mol.L ⁻¹	[BBT base] mol.L ⁻¹	C _{totale} mol.L ⁻¹	pH
Ar sec	30	11,68 10 ⁻⁵	7,14 10 ⁻⁵	18,45 10 ⁻⁵	6,89
Ar sec+CO2	30	12,85 10 ⁻⁵	5,60 10 ⁻⁵	18,45 10 ⁻⁵	6,74
Ar sec	30	14,02 10 ⁻⁵	4,48 10 ⁻⁵	18,50 10 ⁻⁵	6,60
Ar HR75%	60	20,56 10 ⁻⁵	1,37 10 ⁻⁵	21,93 10 ⁻⁵	5,92
Ar HR75%+CO2	60	16,36 10 ⁻⁵	2,52 10 ⁻⁵	18,88 10 ⁻⁵	6,29
Ar HR75%	60	15,48 10 ⁻⁵	2,86 10 ⁻⁵	18,34 10 ⁻⁵	6,37

La variation du pH intrapore de 0,97 unité est beaucoup plus importante que celle observée en exposition statique (0,59 unité pH). Cette différence pourrait être due d'une part au système fluide qui permet soit d'assécher plus rapidement la matrice soit de piéger plus efficacement le CO₂ présent en grande proportion dans le mélange gazeux. Il faut noter que l'action du CO₂ sur le pH intrapore n'est effective que s'il y a suffisamment d'eau dans les pores pour le dissoudre. Pour étudier cet effet, dans une seconde série d'expérience, le CO₂ sera apporté dans des mélanges gazeux humides, à différentes humidités relatives.

Matrice TMOS/APTES 97/3 dopée de BBT : série 2

Dans cette série d'expériences, la matrice est soumise à des variations d'humidité en absence, puis en présence de CO₂, suivant les séquences suivantes.

Séquences d'exposition: sans CO₂

- | | | |
|---|------------------|---------------|
| 1) 15 min sous Ar sec à 1L/min | t= 0 à 15 min | |
| 2) 30 min sous Ar humide, HR=25%, 1 L.min ⁻¹ | t= 15 à 45 min | |
| 3) 60 min sous Ar humide HR=50%, 1 L.min ⁻¹ | t= 45 à 105 min | |
| 4) 60 min sous Ar humide HR=75%, 1 L.min ⁻¹ | t= 105 à 165 min | |
| 5) 30 min sous Ar sec | t= 165 à 195 min | et à la suite |

¹⁴ Solubilité du CO₂ dans l'eau = 1,69 g/L à 20°C. Masse molaire du CO₂ = 44 g

Séquences d'exposition avec CO₂ (40000 ppm)

- | | |
|---|------------------|
| 1) 15 min sous Ar sec à 1 L.min ⁻¹ | t= 195 à 210 min |
| 2) 30 min sous Ar humide, HR=25%, 1 L.min ⁻¹ | t= 210 à 240 min |
| 3) 60 min sous Ar humide HR=50%, 1 L.min ⁻¹ | t= 240 à 300 min |
| 4) 60 min sous Ar humide HR=75%, 1 L.min ⁻¹ | t= 300 à 360 min |
| 5) 30 min sous Ar sec | t= 360 à 390 min |

Les premières séquences d'exposition ont pour but d'obtenir une saturation du monolithe en eau. Les séquences suivantes permettront de voir l'effet additionnel du CO₂. Les résultats obtenus sont résumés dans la Figure 92 et la Figure 93.

Les résultats obtenus pour les premières séquences réalisées en absence de CO₂ sont rationalisés de la manière suivante. Comme il a été précédemment vu, le monolithe initial contient une certaine quantité d'eau. Celle-ci est en quantité suffisante pour solvater les molécules de BBT et pour établir un premier équilibre acido-basique. Le dessèchement de la matrice entre t=0 et 15 min induit une légère diminution de la forme basique du BBT qui est déstabilisée au profit de la forme acide.

L'apport d'Ar humide à HR=25% restaure dans les premières 5 min la forme basique qui est solvatée par l'eau, puis celle-ci commence à diminuer graduellement au profit de la forme acide jusqu'à atteindre une limite à t= 165 min. La quantité d'eau adsorbée a augmenté et est devenue suffisamment importante pour induire la déprotonation des groupements SiOH résiduels et protoner les fonctions amines de l'APTES, induisant une acidification progressive de l'eau intrapore. Le pH intrapore, déterminé à partir de la reconvolution spectrale, varie entre 6,84 et 5,77, soit de 1,07 unités (voir tableau 28). Ce résultat particulièrement important indique que le pH intrapore dépend essentiellement de la quantité d'eau présente dans les pores et des équilibres acido-basiques de SiOH et de l'APTES et du rapport des concentrations [H₂O]/[SiOH]/[aminopropyle].

Nous émettons l'hypothèse que les pores sont saturés d'eau et que le pH intrapore de 5,77 est atteint lorsque toutes les fonctions amines de l'APTES sont protonées. L'apport de CO₂ dans un tel cas ne devrait pas induire une acidification significative de l'eau intrapore. On retrouve ainsi un pH intrapore légèrement plus bas mais équivalent à celui obtenu pour l'exposition statique de la matrice dopée de BBT (pH=5,98) et pour la série 1 d'exposition en mode dynamique au mélange d'Ar à 75% d'humidité relative (pH= 5,92).

Le séchage qui suit de t= 165 à 195 min enlève partiellement l'eau et on retrouve l'équilibre acido-basique de t=20 min

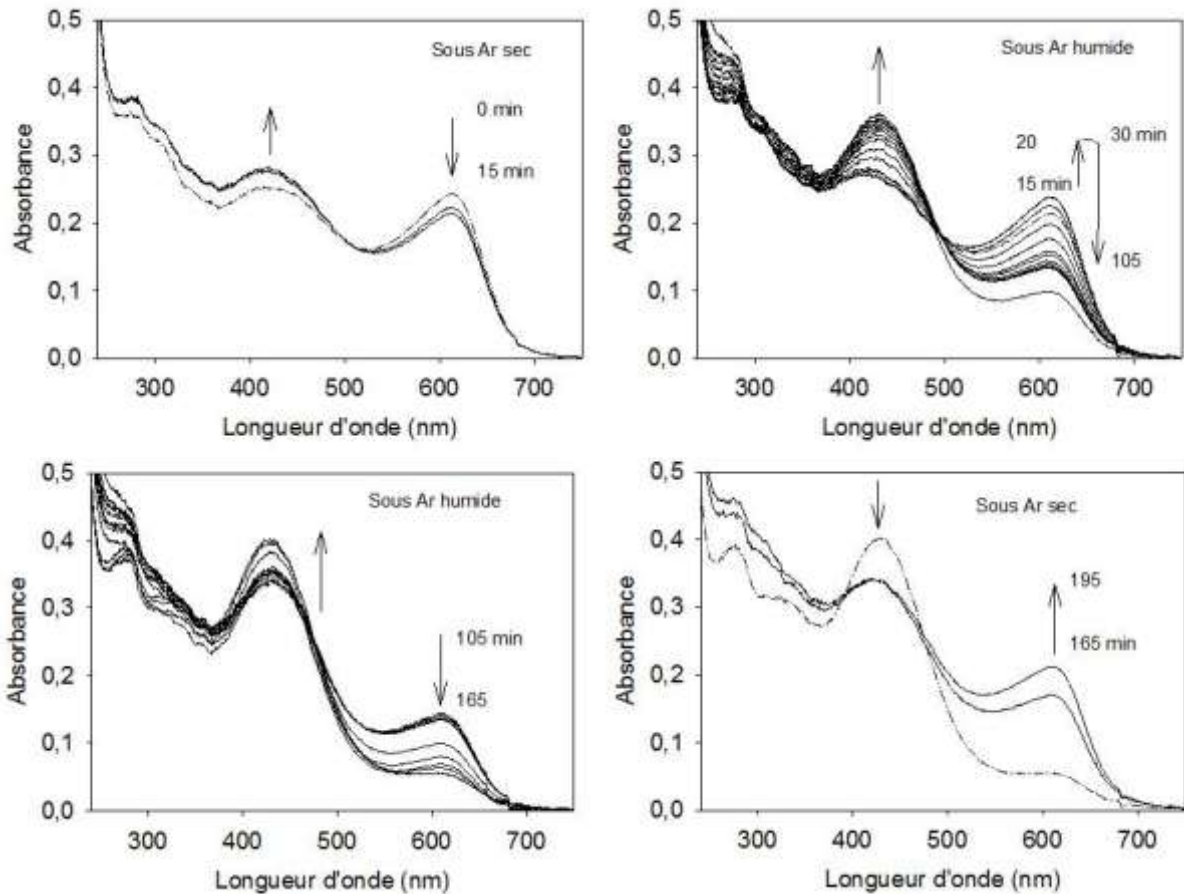


Figure 92. Variations spectrales observées au cours des séquences d'exposition de la matrice TMOS/APTES 97/3 dopée de BBT $1,9 \cdot 10^{-4}$ M à un flux d'Ar ($1 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$) sec ou humide. La courbe en pointillé dans chaque figure correspond à l'instant initial.

Les résultats obtenus pour les séquences réalisées en présence de CO_2 sont rationalisés de la manière suivante (Figure 93). La matrice de départ est celle obtenue après la séquence de séchage sous Ar sec (Figure 92, $t = 195$ min). L'exposition à un flux humide (HR=25%) contenant du CO_2 induit le piégeage de l'eau et du CO_2 , mais la quantité d'eau n'est pas suffisante pour dissoudre ce dernier. En effet, le mélange gazeux contient $41,5 \cdot 10^{-3}$ moles d'Ar, $1,66 \cdot 10^{-3}$ mole de CO_2 (ou 40000 ppm) et $0,3 \cdot 10^{-3}$ mole d'eau (ou 5666 ppm). On observe donc une accumulation d'eau jusqu'à $t=240$ min qui permet de stabiliser l'espèce basique et d'atteindre l'équilibre acido-basique équivalente à celle observée dans la série d'expérience sans CO_2 (voir Figure 92, $t=20$ min). De manière similaire à l'expérience précédente, l'apport en continu d'eau déplace l'équilibre acido-basique vers la forme acide, du fait de la déprotonation des groupements SiOH et la protonation des fonctions amine de l'APTES. Notons toutefois que l'équilibre est déplacé beaucoup plus rapidement vers la forme acide que précédemment. On observe en effet le même résultat à $t=240$ min avec l'apport d'un flux d'Ar à 50% d'humidité relative, en comparaison avec la première expérience où cet équilibre n'est atteint qu'avec un flux humide à 75% (Figure 92, 165 min). Nous attribuons ce résultat à l'acidification de l'eau intrapore en présence de CO_2 . Une partie du CO_2 a été dissoute dans les pores et transformée en acide carbonique, qui contribue à une acidification supplémentaire de l'eau intrapore. Le pH intrapore atteint à cette étape est de 5,88.

L'apport supplémentaire de molécules d'eau avec l'Ar humide (HR=75%) induit en revanche une dilution de l'acidité (compétition entre l'eau et le CO₂) et l'équilibre acido-basique est de nouveau déplacé vers la forme basique jusqu'à atteindre un nouvel équilibre.

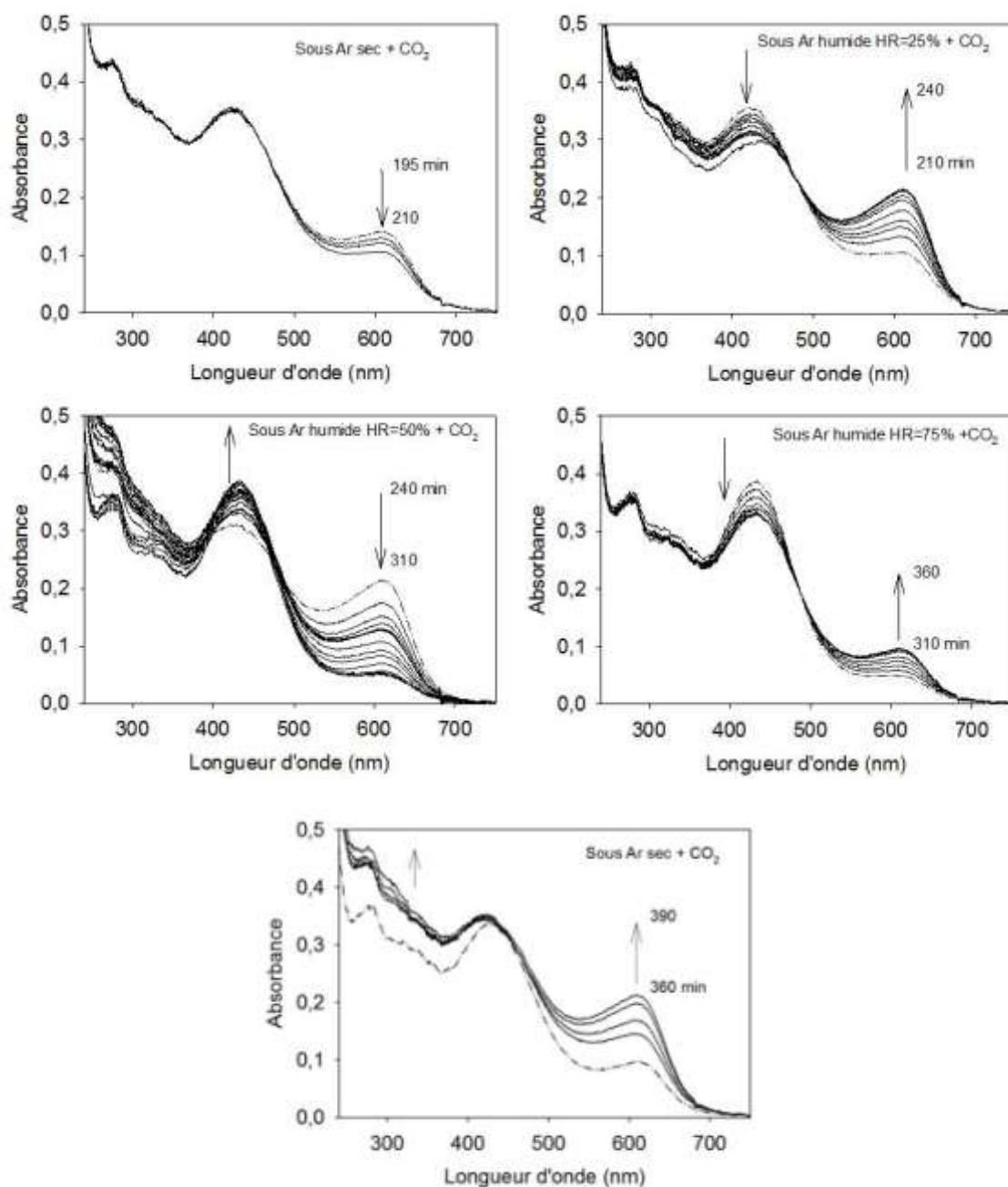


Figure 93. Variations spectrales observées au cours des séquences d'exposition de la matrice TMOS/APTES 97/3 dopée de BBT $1,9 \cdot 10^{-4}$ M à un flux d'Ar ($1 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$) sec ou humide contenant 40000 ppm de CO₂. La courbe en pointillé dans chaque figure correspond à l'instant initial.

Le Tableau 28 résume les données obtenues avec les séquences d'exposition dynamique de la matrice TMOS/APTES 97/3 dopée de BBT.

Tableau 28 : Données extraites des mesures d'exposition dynamique de la matrice TMOS/APTES 97/3 dopée de BBT $1,9 \cdot 10^{-4}$ mol.L⁻¹ à des mélanges gazeux secs et humides en absence ou en présence de CO₂

	CO ₂ ppm	HR%	Durée (min)	[BBT acide] (mol.L ⁻¹)	[BBT base] (mol.L ⁻¹)	C _{totale} (mol.L ⁻¹)	pH
Série 2							
Ar sec, t= 0				12,27 10 ⁻⁵	6,72 10 ⁻⁵	18,99 10 ⁻⁵	6,84
Ar sec, t= 15 min		0	15	14,02 10 ⁻⁵	5,88 10 ⁻⁵	19,90 10 ⁻⁵	6,62
Ar humide, t=30 min		25	30	13,03 10 ⁻⁵	6,02 10 ⁻⁵	19,05 10 ⁻⁵	6,76
Ar humide, t= 45 min		50	15	13,73 10 ⁻⁵	6,22 10 ⁻⁵	19,95 10 ⁻⁵	6,75
Ar humide, t= 105 min		50	45	18,81 10 ⁻⁵	3,56 10 ⁻⁵	22,37 10 ⁻⁵	6,38
Ar humide, t= 165 min		75	60	21,09 10 ⁻⁵	0,98 10 ⁻⁵	22,07 10 ⁻⁵	5,77
Ar sec, t= 195 min		0	30	17,99 10 ⁻⁵	3,92 10 ⁻⁵	21,91 10 ⁻⁵	6,43
Ar sec, t= 210 min	40000	0	15	18,10 10 ⁻⁵	2,46 10 ⁻⁵	20,56 10 ⁻⁵	6,23
Ar humide, t= 240 min	40000	25	30	15,77 10 ⁻⁵	5,85 10 ⁻⁵	21,62 10 ⁻⁵	6,67
Ar humide, t= 300 min	40000	50	60	22,49 10 ⁻⁵	1,34 10 ⁻⁵	23,83 10 ⁻⁵	5,88
Ar humide, t= 360 min	40000	75	60	17,23 10 ⁻⁵	2,24 10 ⁻⁵	19,47 10 ⁻⁵	6,21
Ar sec, t= 390 min	40000	0	30	17,52 10 ⁻⁵	4,20 10 ⁻⁵	21,72 10 ⁻⁵	6,48

$$C_{\text{totale}} = [\text{BBT acide}] + [\text{BBT base}]$$

Le pH intrapore peut donc évoluer entre les valeurs de 6,84 et 5,77 selon la quantité d'eau présente dans la matrice et selon la quantité de CO₂ dissous dans les pores. Ces valeurs extrêmes dépendent essentiellement du rapport des concentrations des groupements SiOH et amino de l'APTES.

Jusqu'à présent, les matrices initialement utilisées pour les expériences d'exposition à des flux gazeux humides, ont toujours contenu de l'eau. Il est intéressant de savoir s'il est possible de dessécher complètement la matrice poreuse et de connaître ses propriétés lors de la ré-humidification. Cette étude est réalisée avec une autre matrice dopée TMOS/APTES 97/3 dopée de BBT $3,5 \cdot 10^{-4}$ M.

La matrice dopée de BBT $3,5 \cdot 10^{-4}$ mol.L⁻¹ est préalablement desséchée sous un flux d'Ar sec (1 L.min⁻¹) pendant 24 heures (Figure 94). Elle est ensuite exposée à un flux d'Ar humide (HR=75%) pendant 44 heures. Les spectres collectés sont reproduits dans les figures qui suivent.

La matrice initiale conservée dans un pilulier contient de l'eau et on observe la présence des deux espèces acide et base du BBT. Lors du séchage du monolithe, l'équilibre acido-basique est déplacé vers la forme acide. En environ 10 heures, ce déplacement est presque total et le spectre d'absorption ne change plus jusqu'à 24 heures. On observe cependant une absorbance résiduelle, bien que faible à 614 nm, qui témoigne de la présence d'une très faible concentration de la forme déprotonée. Il semble donc très difficile d'enlever totalement l'eau interstitielle dans un matériau nanoporeux.

Lors de l'exposition du monolithe dopé de BBT et séché à un flux humide d'Ar (1L.min⁻¹, 75% HR), on observe un déplacement bathochrome des maxima des bandes d'absorption dès les deux premières heures. Ces déplacements spectraux sont indicatifs de la solvatation du BBT par les molécules d'eau. Aucun changement spectral n'est observé entre 26 et 46 heures. Le remplissage d'eau dans les pores est lent et ce n'est qu'à partir de 48H que la quantité d'eau devient suffisante pour stabiliser la forme basique du BBT. L'équilibre acido-basique est alors déplacé graduellement vers la forme basique. La concentration de cette dernière semble atteindre un palier à 58H, puis l'équilibre acido-basique est de nouveau déplacé vers la forme acide lorsque la concentration d'eau

est suffisamment élevée pour commencer à induire la déprotonation des groupements SiOH et la protonation des fonctions amines de l'APTES. Cette évolution est en accord avec les phénomènes observés précédemment dans les autres expériences.

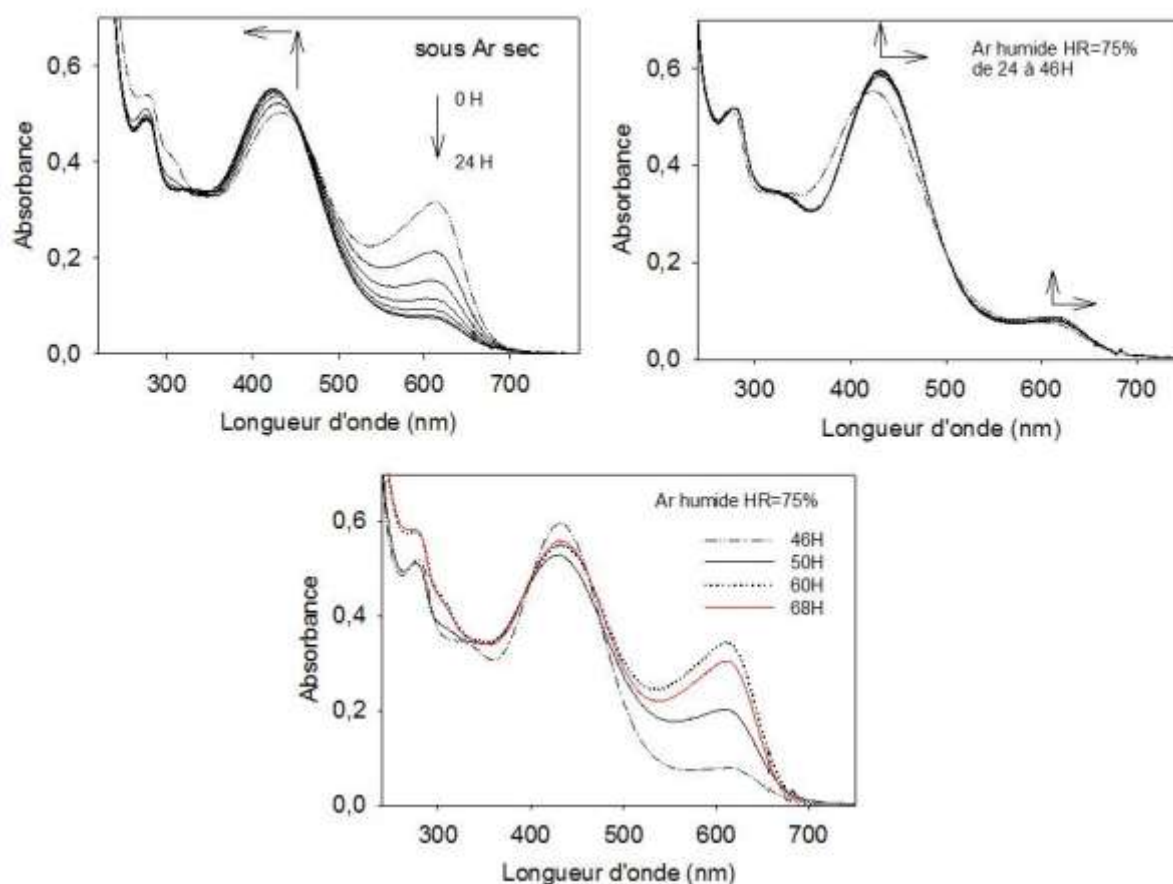


Figure 94. Haut gauche : Séchage de la matrice matrice TMOS/APTES 97/3 dopée de BBT $3,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ avec exposition à un flux d'Ar sec. Haut droite : Exposition à un flux humide (1L.min^{-1} , 75% HR) pendant 22 H. Bas : exposition en continu jusqu'à 68H. La courbe en pointillé dans chaque figure correspond à l'instant initial.

Cette expérience montre clairement que lorsqu'on réinjecte de la vapeur d'eau à une matrice bien séchée, les molécules d'eau disponibles solvatent en premier le BBT présent sous la forme acide. Cette solvatation est visible dès les deux premières heures avec le déplacement bathochrome du maximum d'absorption de la bande d'absorption du BBT acide. Il faut 20H supplémentaires pour avoir une quantité d'eau suffisante pour stabiliser la forme basique du BBT et déplacer l'équilibre acido-basique. Cet équilibre va dépendre de la quantité d'eau présente dans les pores. Les molécules d'eau, en induisant la déprotonation des groupements SiOH et la protonation des fonctions amines de l'APTES, vont imposer l'équilibre acido-basique.

Avec la matrice TMOS/APTES 97/3, la concentration des groupements amines est de $0,47 \text{ mol.L}^{-1}$ et celle estimée des groupements SiOH est de $1,37 \text{ mol.L}^{-1}$. Nous avons pu observer avec les expériences d'exposition réalisées en mode statique que l'acidification du pH intrapore ne démarre que lorsque la concentration d'eau intrapore atteint $\sim 4,1 \text{ mol.L}^{-1}$, soit pour un rapport de 3 molécules d'eau pour une fonction SiOH ou de 9 molécules d'eau pour une fonction amine. Le pH intrapore alors d'environ 6,6 peut diminuer d'une unité de pH lorsque les pores sont remplis d'eau et que la protonation des fonctions amines est totale. Le pH minimum est atteint lorsque la concentration

d'eau intrapore est de $22,3 \text{ mol.L}^{-1}$, soit pour un rapport de 48 molécules d'eau pour une fonction amine ou de 16 molécules d'eau pour 1 SiOH. Une augmentation de la proportion d'APTES dans les matrices TMOS/APTES pourrait contribuer à diminuer cet effet d'acidification et permettre l'obtention d'un pH intrapore constant. De même, l'effet de la dissolution du gaz carbonique aurait un effet moindre sur l'acidification de l'eau intrapore. Ces hypothèses sont examinées avec les études réalisées avec la matrice TMOS/APTES 80/20, pour laquelle les concentrations de groupements silanol résiduels et d'amine sont respectivement de $1,816 \text{ mol.L}^{-1}$ et $0,454 \text{ mol.L}^{-1}$ dans le sol, soit de $1,72 \text{ mol.L}^{-1}$ et $2,88 \text{ mol.L}^{-1}$ après synérèse. Selon les hypothèses émises, la protonation des fonctions amines ne démarrerait que lorsque la concentration d'eau atteint $\sim 25,9 \text{ mol.L}^{-1}$ (9 molécules d'eau pour 1 fonction amine) et ne pourrait jamais être totale car la concentration d'eau maximale n'est que $26,4 \text{ mol.L}^{-1}$.

IV.3 Expositions des matrices de TMOS/APTES 80/20 vierge et dopées de BBT

IV.3.1 Exposition statique

Les mêmes expériences réalisées avec la matrice TMOS/APTES 97/3 sont ici répétées pour déterminer la vitesse d'adsorption d'eau par les matrices TMOS/APTES 80/20 vierge et dopée de BBT ainsi que le pH intrapore. La Figure 95 et le Tableau 29 regroupent les données obtenues pour les deux matrices vierge et dopée de BBT dont les masses et volumes respectifs sont égaux à 52,12 et 56,9 mg et 0,046 et 0,045 cm^3 . La matrice TMOS/APTES 80/20, du fait de la forte concentration de chaînes aminopropyle, est moins hydrophile que la matrice TMOS/APTES 97/3. De ce fait, la vitesse d'adsorption de l'eau dans la matrice TMOS/APTES 80/20 vierge est plus lente, de $0,158 \text{ mg.min}^{-1}$, par rapport à celle de la matrice TMOS/APTES 97/3 vierge ($0,252 \text{ mg.min}^{-1}$), pour un volume poreux à peu près similaire ($0,422$ et $0,473 \text{ cm}^3.\text{g}^{-1}$, respectivement pour les rapports TMOS/APTES de 80/20 et 97/3). Néanmoins, on peut constater que les pores sont saturés d'eau au bout de 500 min, quelle que soit la matrice.

Tableau 29. Comparaison des propriétés des deux matrices TMOS/APTES 80/20 vierge et dopée de BBT 4,5 $10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$

Système	H ₂ O total mg	V _{ads} (H ₂ O) mg.min ⁻¹	V _{poreux} cm ³ .g ⁻¹	V _{abs} (λ nm) ¹⁵ min ⁻¹	V _{abs} (λ nm) ¹⁵ mg ⁻¹
Matrice vierge	22,0	0,158	0,422	2035 nm : $1,23 \cdot 10^{-2}$ 2230 nm : $8,8 \cdot 10^{-3}$ 1440 nm : $4,9 \cdot 10^{-3}$	$8,6 \cdot 10^{-2}$ $4,9 \cdot 10^{-2}$ $2,1 \cdot 10^{-2}$
Matrice dopée de BBT	19,7	0,232	0,346	2100 nm : $1,38 \cdot 10^{-2}$ 2230 nm : $1,2 \cdot 10^{-2}$ 1440 nm : $6,8 \cdot 10^{-3}$	$6,5 \cdot 10^{-2}$ $5,9 \cdot 10^{-2}$ $2,8 \cdot 10^{-2}$

Le dopage de la matrice avec une molécule hydrophile accélère l'adsorption de l'eau. Les valeurs des vitesses d'adsorption d'eau et d'augmentation des absorbances proche-IR des bandes d'absorption des groupements Si-OH liés aux molécules d'eau en témoignent (Tableau 29). La présence des groupements aminés de l'APTES et celle de l'eau à différentes concentrations dans les pores vont

¹⁵ Les spectres UV-visible-pIR en fonction de la durée d'exposition à de la vapeur d'eau ainsi que les courbes représentant l'augmentation des absorbances pIR en fonction du temps et en fonction de la masse d'eau accumulée sont regroupés dans l'Annexe IV

régir le pH intrapore. Les spectres UV-Visible du BBT collectés en fonction de la durée d'exposition de la matrice à de la vapeur d'eau témoignent de ce phénomène.

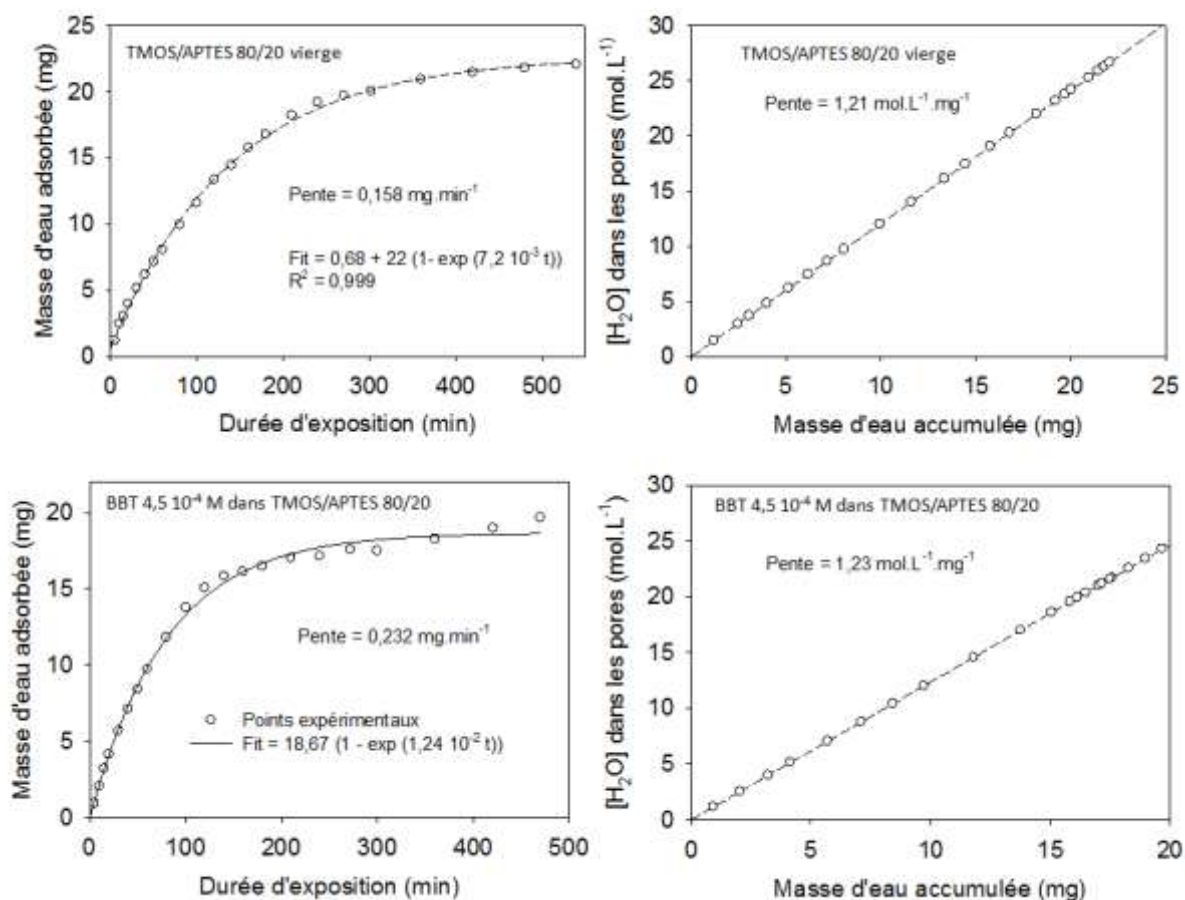


Figure 95. Gauche haut et bas : Masse d'eau accumulée dans les matrices TMOS/APTES 80/20 vierge et dopée de BBT 4,5 10⁻⁴ mol.L⁻¹ en fonction de la durée d'exposition à de la vapeur saturante d'eau. Droite haut et bas: Concentration d'eau dans les pores en fonction de la masse d'eau accumulée au cours du temps.

Dès les premières minutes d'exposition de la matrice à la vapeur d'eau, on observe une diminution de l'absorbance résiduelle à 438 nm, correspondant à la forme acide du BBT qui disparaît totalement en 80 minutes au profit de la bande d'absorption de la forme basique qui augmente progressivement. A partir de 80 min, alors que l'augmentation de l'absorbance à 620 nm atteint un plateau, on observe l'apparition d'une nouvelle absorbance autour de 350 nm (Figure 96, gauche). Cette dernière augmente continuellement alors que l'absorbance à 620 nm commence à re-diminuer (Figure 96 droite). L'augmentation de l'absorbance à 350 nm semble être corrélée à la diminution d'absorbance à 620 nm.

Ces observations sont rationalisées de la manière suivante. Similairement aux phénomènes observés pour le BBT dans la matrice TMOS/APTES 97/3, les molécules d'eau solvatent en premier le BBT et le pH intrapore favorise la stabilisation de la forme basique. Ce phénomène dure environ 80 min au bout desquelles la concentration d'eau intrapore a atteint 14,6 mol.L⁻¹ (voir Figure 95).

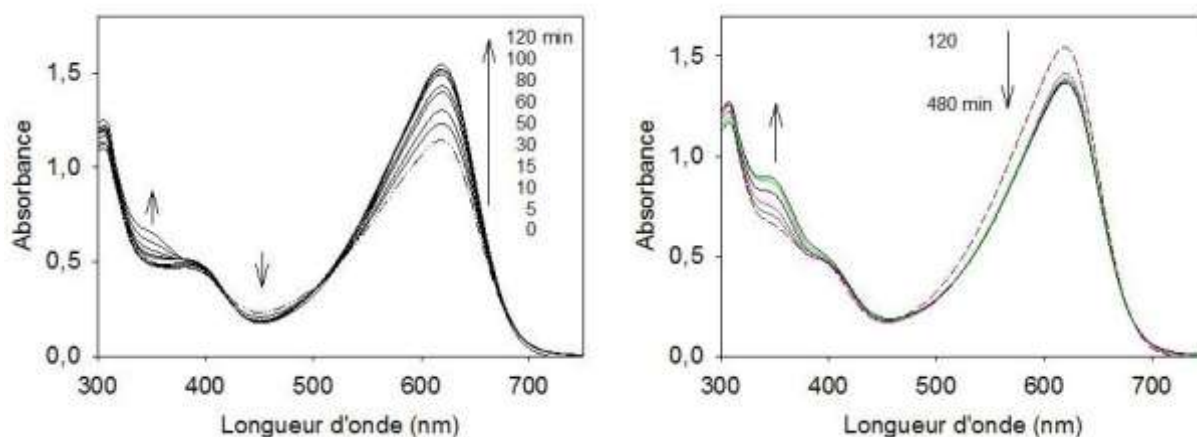


Figure 96. Variations spectrales UV-visible du BBT $4,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ dans une matrice TMOS/APTES 80/20 au cours de son exposition à de la vapeur d'eau saturante pendant 480 min. Les courbes en pointillé dans chaque figure correspondent au temps initial. La courbe en pointillé dans chaque figure correspond à l'instant initial.

La quantité d'eau serait devenue suffisamment importante pour induire la déprotonation des groupements SiOH et la protonation des groupements aminopropyle de l'APTES. Rappelons que pour la matrice TMOS/APTES 97/3 contenant $0,47 \text{ mol.L}^{-1}$ de groupements aminopropyle, ce phénomène intervient lorsque le rapport entre molécules d'eau et groupement aminés est de ~ 9 et la protonation n'est totale que lorsque ce rapport devient égal à 48. La protonation des groupements amine ne serait donc que partielle dans la matrice TMOS/APTES 80/20. Cette protonation induit toutefois un changement important de la polarité du milieu environnant le BBT. Ainsi, nous attribuons l'augmentation de l'absorbance à $\sim 350 \text{ nm}$ au déplacement hypsochrome de la transition de plus haute énergie du BBT, du à son interaction avec la chaîne aminopropyle protonée. Cette transition, comme nous l'avions noté, semble plus sensible au milieu environnant. Un premier déplacement hypsochrome avait déjà été observé lorsque le milieu solvatant, l'eau basique, a été remplacé par la matrice solide TMOS/APTES 80/20 (voir Figure 84). La quantité d'eau n'étant pas suffisante pour à la fois stabiliser l'espèce anionique et la chaîne aminopropyle protonée, ces deux espèces pourraient former une paire d'ions solvatés. Cette hypothèse permettrait d'expliquer la faible diminution du coefficient d'absorption de la bande d'absorption du BBT basique à 620 nm et son léger déplacement hypsochrome comparée à celle du BBT dans une matrice TMOS/APTES 80/20 sèche.

A partir des spectres d'absorption UV-visible, nous avons déduit la proportion des formes acide et basique pour déterminer le pH intrapore. Dans un premier temps, nous ne tiendrons compte que de la présence des formes acides et bases « libres » solvatées. Le Tableau 30 et la Figure 97 résument les données déduites des reconvolutions spectrales.

Tableau 30 : Données extraites des re-convolutions spectrales à différents temps d'exposition statique de la matrice TMOS/APTES 80/20 dopée de BBT $4,5 \cdot 10^{-4}$ mol.L⁻¹ à de la vapeur d'eau saturante

Durée exposition (min)	[BBT acide] mol.L ⁻¹	[BBT base] mol.L ⁻¹	C _{totale} mol.L ⁻¹	pH	[H ₂ O] Mol.L ⁻¹
0	$0,92 \cdot 10^{-4}$	$3,15 \cdot 10^{-4}$	$4,07 \cdot 10^{-4}$	7,63	
80	$0,41 \cdot 10^{-4}$	$4,16 \cdot 10^{-4}$	$4,57 \cdot 10^{-4}$	8,11	14,6
120	$0,53 \cdot 10^{-4}$	$4,34 \cdot 10^{-4}$	$4,87 \cdot 10^{-5}$	8,02	18,6
480	$0,64 \cdot 10^{-4}$	$3,84 \cdot 10^{-5}$	$4,48 \cdot 10^{-5}$	7,88	24,3

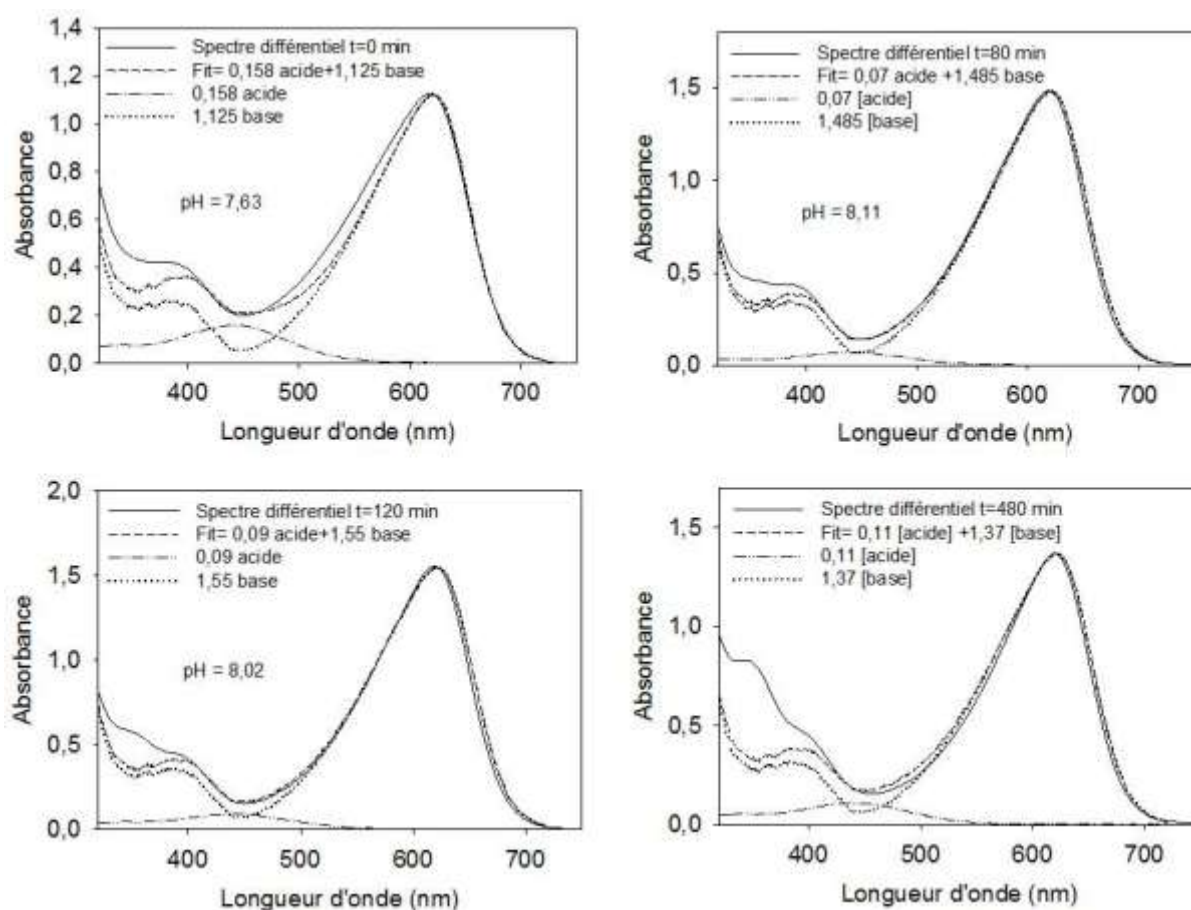


Figure 97. Comparaison des spectres d'absorption du BBT dans la matrice TMOS/APTES 80/20 avant et après l'exposition à de la vapeur d'eau saturante avec le spectre reconstruit à partir des spectres de chaque espèce à t= 0, 80, et 480 min. La reconstruction est faite à partir des spectres de la forme acide du BBT dans une matrice TMOS pure et de la forme basique du BBT dans une matrice TMOS/APTES 80/20.

Les données issues des reconvolutions spectrales viennent étayer les hypothèses émises. A t= 0 min, l'eau interstitielle est en trop faible quantité pour stabiliser totalement la forme basique. Une proportion de la forme acide est toujours présente, mais en très faible quantité et le pH intrapore est de 7,63. La concentration de cette dernière diminue au profit de la forme basique qui augmente graduellement et de façon continue avec l'exposition à la vapeur d'eau. A 80 min, lorsque la forme basique du BBT est complètement stabilisée, le pH intrapore est de 8,11. La concentration d'eau intrapore, de 14,6 mol.L⁻¹, est alors encore insuffisante pour déprotoner les groupements silanol et protoner tous les groupements amine de l'APTES. A partir de 120 min, la concentration d'eau intrapore, de 18,6 mol.L⁻¹, devient suffisante pour commencer à protoner les groupements amine (9 molécules d'eau/groupement NH₂), induisant une acidification de l'eau intrapore. Le pH diminue et devient égal à 8,02. Lorsque les pores sont totalement remplis d'eau, la concentration d'eau n'est

toujours pas suffisante pour protoner tous les groupements NH_2 et le pH intrapore ne devrait plus subir de variation.

Cette première interprétation n'est cependant pas satisfaisante car les spectres reconvolués ne permettent pas de tenir compte de l'augmentation d'absorbance entre 230 et 400 nm (Figure 97). Nous avons émis l'hypothèse que la forme basique du BBT se trouverait sous la forme d'une paire d'ion solvatée, liée avec un groupement NH_3^+ d'une chaîne aminopropyle et que les transitions du BBT subissent des changements : une diminution du coefficient d'extinction molaire de la transition à plus basse énergie à 620 nm et un déplacement hypsochrome de la bande à plus haute énergie vers 350 nm.

Pour étayer ces hypothèses, nous avons déterminé le spectre hypothétique de la paire d'ions « BBT base- NH_3^+ » afin de réaliser de nouvelles reconvolutions spectrales. Le spectre du « BBT base- NH_3^+ » est obtenu en supposant que toutes les molécules de BBT base sont sous forme de paires d'ions lorsque les pores sont totalement remplis d'eau à 480 min. Les spectres de la paire d'ion et du BBT basique libre sont comparés dans la figure suivante.

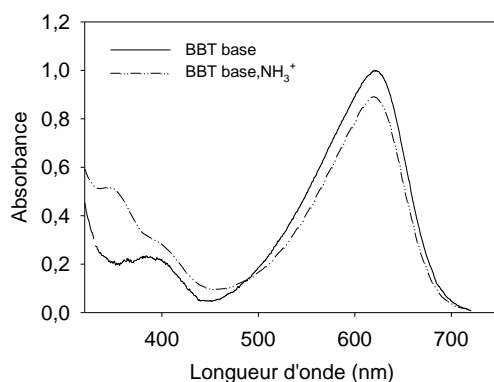


Figure 98. Comparaison du spectre de BBT basique avec le spectre hypothétique de la paire d'ions « BBT base- NH_3^+ ».

Les reconvolutions spectrales à $t = 80$ et 120 min, tenant compte de la coexistence du BBT base libre et de la paire d'ions, sont montrées dans la figure suivante. Dans les deux cas, un excellent fit a pu être obtenu en tenant compte uniquement des deux formes basiques du BBT, libres et associée à NH_3^+ . Ce résultat implique que le pH intrapore doit être supérieur à 8,11 dès $t = 80$ min (comparer la Figure 97 et la Figure 99), lorsque la concentration d'eau intrapore est égale à $33,2 \text{ mol.L}^{-1}$. Ce pH ne diminuerait pas car l'équilibre acido-basique n'est pas déplacé vers la forme acide. En revanche, la concentration de la forme base libre diminue au profit de celle de la paire d'ions. Le pH intrapore de la matrice TMOS/APTES varie donc très peu en présence d'eau et reste basique quel que soit la quantité d'eau accumulée.

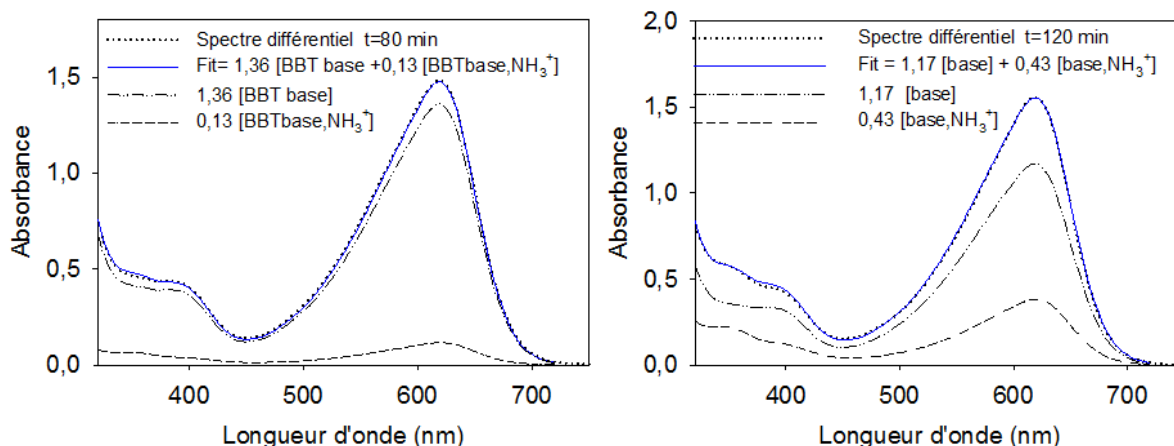


Figure 99. Comparaison des spectres différentiels et des spectres reconvoqués du BBT dans TMOS/APTES 80/20 après 80 et 120 min d'exposition à de la vapeur saturante. Les reconvolutions spectrales tiennent compte de la présence de la base libre (BBT base) et de la paire d'ions (BBT, NH_3^+)

La présence de CO_2 piégé dans les pores pourrait-elle contribuer à acidifier le pH intrapore de la matrice TMOS/APTES 80/20 ? La réponse à cette question est apportée avec l'étude suivante.

IV.3.2 Exposition dynamique de la matrice TMOS/APTES dopée de BBT

Afin d'étudier l'effet potentiel du CO_2 dissous dans les pores sur le pH intrapore, nous avons exposé la matrice à des flux humides d'Ar en absence puis en présence de CO_2 . Les séquences suivantes sont réalisées :

Séquences d'exposition: sans CO_2

- | | | |
|---|------------------|---------------|
| 1) 15 min sous Ar sec à $1 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ | t= 0 à 15 min | |
| 2) 30 min sous Ar humide, HR=25%, $1 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ | t= 15 à 45 min | |
| 3) 60 min sous Ar humide HR=50%, $1 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ | t= 45 à 105 min | |
| 4) 60 min sous Ar humide HR=75%, $1 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ | t= 105 à 165 min | |
| 5) 30 min sous Ar sec | t= 165 à 195 min | et à la suite |

Séquences d'exposition avec CO_2 (40000 ppm)

- | | |
|---|------------------|
| 1) 15 min sous Ar sec à $1 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ | t= 195 à 210 min |
| 2) 30 min sous Ar humide, HR=25%, $1 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ | t= 210 à 240 min |
| 3) 60 min sous Ar humide HR=50%, $1 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ | t= 240 à 300 min |
| 4) 60 min sous Ar humide HR=75%, $1 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ | t= 300 à 360 min |
| 5) 30 min sous Ar sec | t= 360 à 390 min |

Les résultats obtenus sont résumés dans la Figure 100. Lors du dessèchement de la matrice entre 0 et 15 min, on n'observe aucun changement spectral. L'exposition de la matrice au flux humide d'Ar à diverses humidités relatives a pour effet de stabiliser la forme basique du BBT dont l'absorbance augmente au cours du temps. La quantité d'eau introduite dans les pores ne semble pas suffisante pour induire significativement la déprotonation des groupements silanol et la protonation des fonctions amine de l'APTES, qui sont en forte concentration. Ces résultats corroborent ceux obtenus avec l'exposition statique de la matrice.

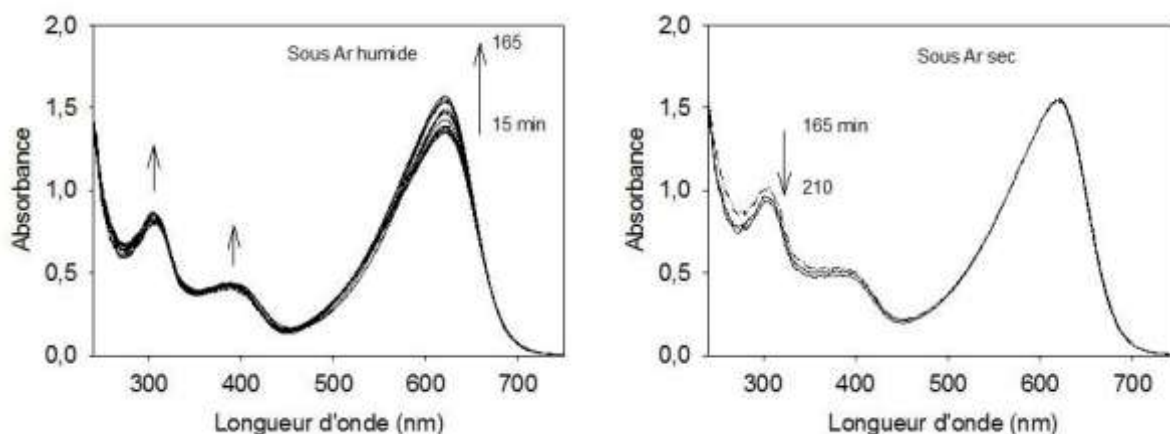


Figure 100. Variations spectrales lors de l'exposition d'une matrice TMOS/APTES 80/20 dopée de BBT $4,5 \cdot 10^{-4}$ M à un flux humide d'Ar selon les séquences définies. Entre 0 et 15 min, le spectre initial est invariable. La courbe en pointillé correspond à l'instant initial.

Les séquences d'exposition aux mélanges gazeux humides en présence de CO_2 en revanche induisent des changements plus importants (Figure 101). Avec l'apport d'humidité entre 210 et 300 min, une partie des molécules de CO_2 piégées dans la matrice se dissolvent et contribuent à acidifier le pH intrapore. On observe alors une diminution de l'espèce basique au profit de l'espèce acide. Cet effet est cependant restreint du fait de la limite de solubilité du CO_2 dans l'eau des pores. Ainsi, à partir de 300 min, avec l'apport supplémentaire d'eau qui dilue la concentration du CO_2 dissous, on observe une ré-augmentation de la forme basique qui atteint sa concentration initiale.

Similairement au résultat de l'exposition statique, nous observons également une augmentation de l'absorbance entre 230 et 400 nm. Celle-ci apparaît lorsque le milieu est acidifié par la dissolution du CO_2 (Figure 101, droite), induisant la protonation des fonctions amine.

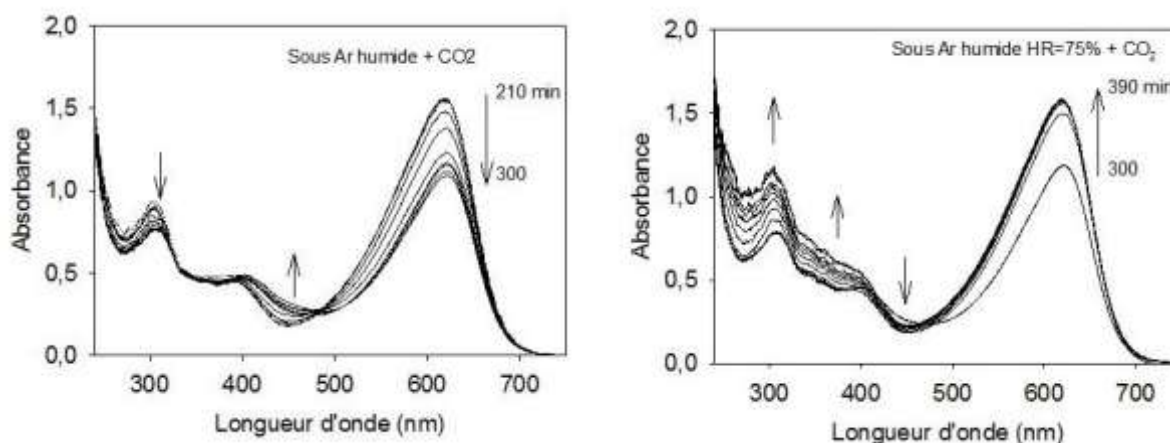


Figure 101. Variations spectrales lors de l'exposition d'une matrice TMOS/APTES 80/20 dopée de BBT $4,5 \cdot 10^{-4}$ M à un flux humide d'Ar contenant 40000 ppm de CO_2 . Gauche : avec de l'Ar humide à 25% et à 50%. Droite : avec de l'Ar humide à 75%.

Le pH intrapore est déterminé à 210 et 300 min d'exposition. La Figure 102 montre les spectres différentiels et reconvoqués à partir desquels sont obtenues les absorbances des espèces acide et basique en équilibre. Dans un premier temps, les reconvolements ne tiennent pas compte de la présence éventuelle de la paire d'ions, (BBT base , NH_3^+). On observe un écart de plus en plus important entre le spectre différentiel et le spectre reconvoqué à partir des formes acides et bases du

BBT, à partir de $t=300$ min, lorsque la concentration d'eau accumulée dans la matrice devient suffisamment importante pour protoner les fonctions amine de l'APTES.

Les spectres reconvolués pour $t= 300$ et 390 min en tenant compte de la présence de la paire d'ions corrént beaucoup mieux aux spectres différentiels correspondants. On constate dans ce cas que la variation du pH intrapore en présence de CO_2 est beaucoup plus faible : sa valeur varie entre 8,51 et 7,93, soit seulement de 0,58 unité pH, comparativement à 0,68 lorsque l'existence de la paire d'ions n'est pas prise en compte.

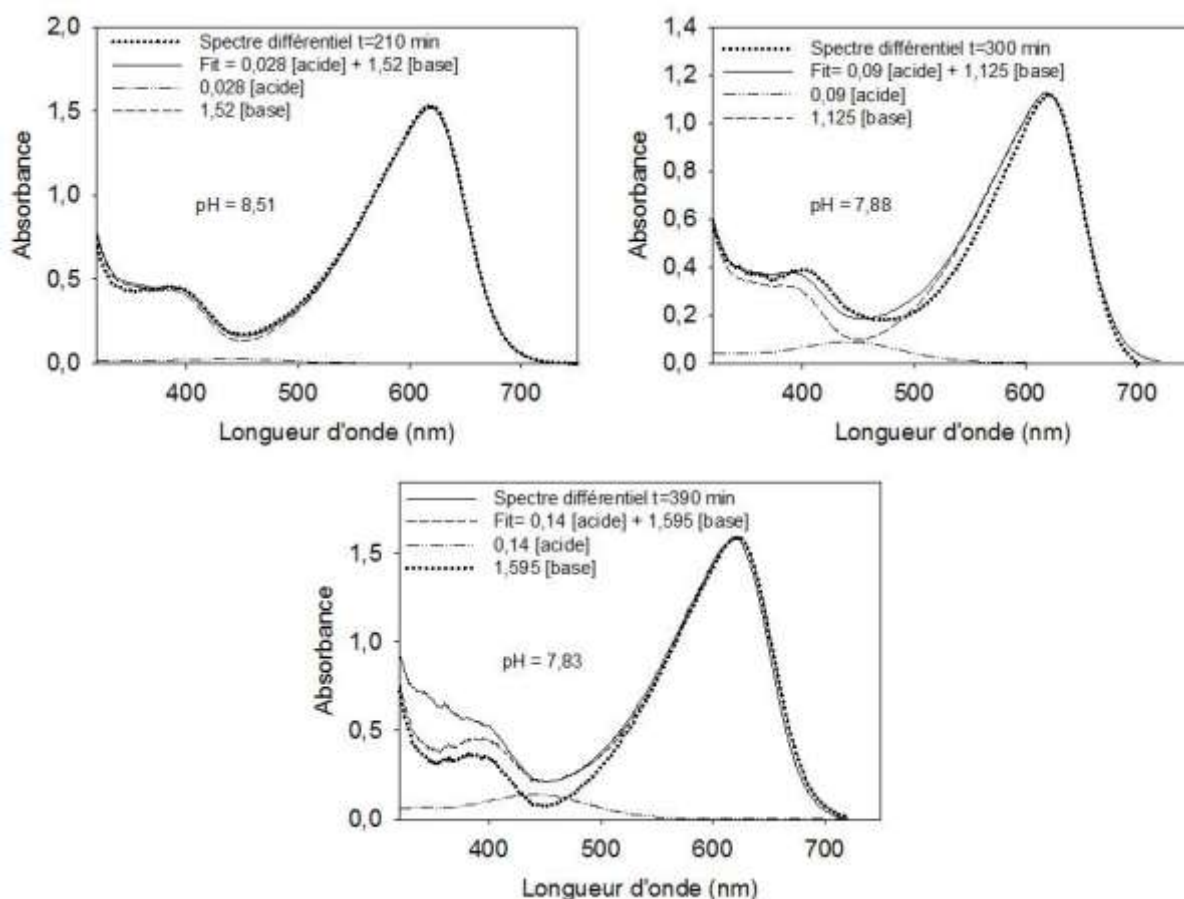


Figure 102. Reconvolution spectrale des spectres différentiels à $t= 210, 300$ et 390 min du BBT $4,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ dans la matrice TMOS/APTES 80/20 exposé à de l'Ar humide en présence de 40000 ppm de CO_2 .

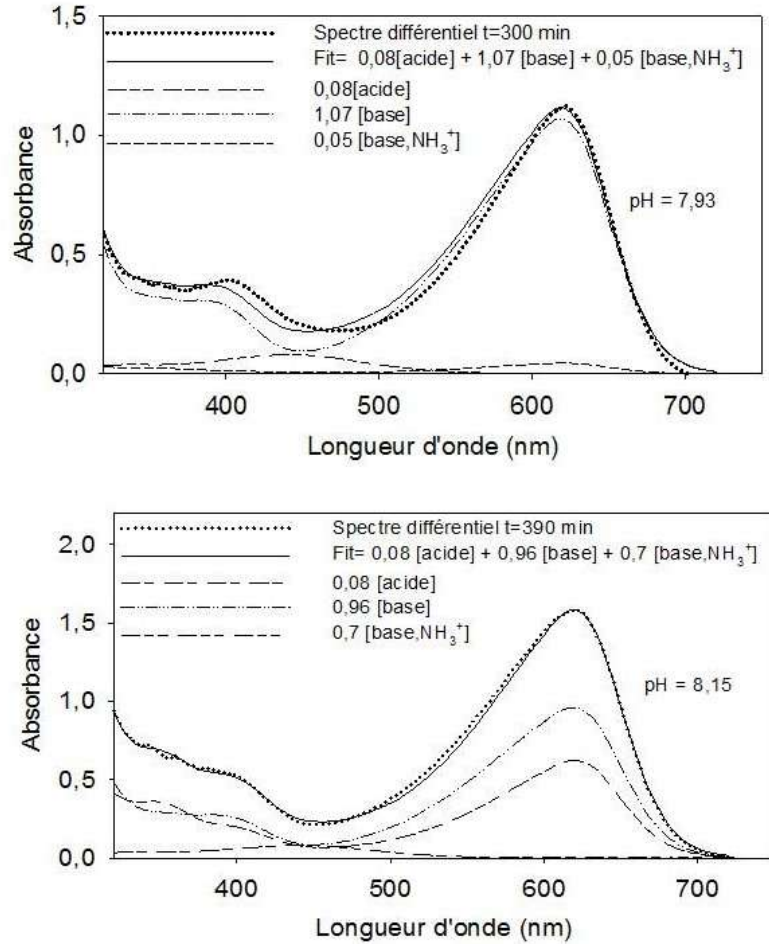


Figure 103. Reconvolution spectrale des spectres différentiels à $t = 210, 300$ et 390 min du BBT $4,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ dans la matrice TMOS/APTES 80/20 exposé à de l'Ar humide en présence de 40000 ppm de CO_2 , en tenant compte de l'existence de la paire d'ions (base, NH_3^+)

Les valeurs des concentrations de chaque espèce déduites des reconvolutions spectrales sont regroupées dans le tableau suivant.

Tableau 31. Données extraites des re-convolutions spectrales à différents temps d'exposition dynamique de la matrice TMOS/APTES 80/20 dopée de BBT $4,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ à des mélanges gazeux humides contenant 40000 ppm de CO_2

Temps t (min)	[BBT acide] mol.L^{-1}	[BBT base] mol.L^{-1}	[BBT base, NH_3^+] mol.L^{-1}	C_{totale} mol.L^{-1}	pH	$[\text{H}_2\text{O}]$ Mol.L^{-1}
210	$0,16 \cdot 10^{-4}$	$4,26 \cdot 10^{-4}$		$4,42 \cdot 10^{-4}$	8,51	21,0
300	$0,53 \cdot 10^{-4}$	$3,15 \cdot 10^{-4}$		$3,68 \cdot 10^{-4}$	7,88	21,6
390	$0,82 \cdot 10^{-4}$	$4,47 \cdot 10^{-4}$		$5,29 \cdot 10^{-4}$	7,83	23,0
300	$0,47 \cdot 10^{-4}$	$3,00 \cdot 10^{-4}$	$0,18 \cdot 10^{-4}$	$3,65 \cdot 10^{-4}$	7,93	21,6
390	$0,47 \cdot 10^{-4}$	$2,69 \cdot 10^{-4}$	$2,52 \cdot 10^{-4}$	$5,21 \cdot 10^{-4}$	8,15	23,0

Avec la matrice TMOS/APTES 80/20 dopée de BBT, le pH intrapore est peu sensible à la présence d'eau même acidifiée en présence de CO_2 . Le pH ne varie que de 0,58 unité comparativement à la matrice TMOS/APTES 97/3 (1,07 unités pH). Ce résultat est particulièrement intéressant pour la production de capteurs peu sensibles à la vapeur d'eau et au CO_2 .

Jusqu'à présent, pour déterminer le pH intrapore, nous avons dû raisonner en utilisant des paramètres macroscopiques comme le volume total de la matrice poreuse et les concentrations de BBT et d'eau se rapportant à ce volume. Ce raisonnement ne tient pas compte de la distribution de tailles des pores ni de celle des molécules de BBT et d'eau dans ces différents pores. En effet, certains pores peuvent être exempts de molécules de BBT et contenir néanmoins de l'eau et d'autres peuvent contenir les deux avec des quantités d'eau différentes. Or la distribution de tailles de pores est connue avec l'établissement de l'isotherme d'adsorption et son analyse par la méthode DFT. Avec la connaissance de cette distribution, nous avons voulu estimer le nombre de molécules de BBT et le nombre de molécules d'eau par pore dans un monolithe.

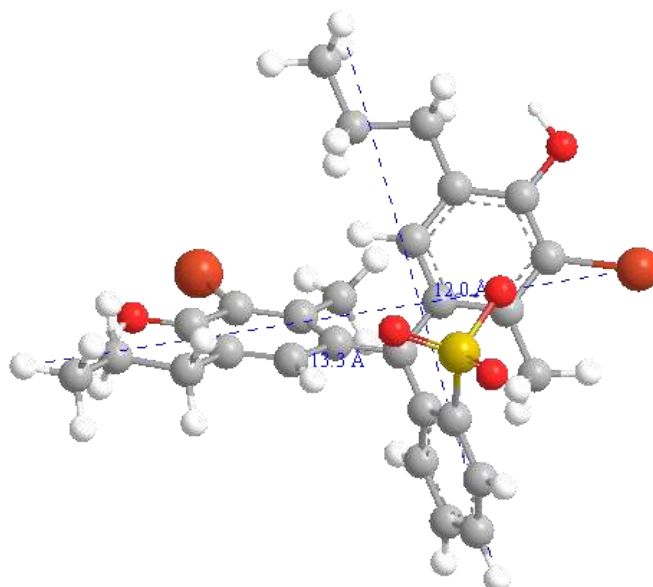
IV.4 Estimation de la répartition des molécules de BBT et d'eau dans les pores

A partir de la méthode d'analyse DFT de l'isotherme d'adsorption d'azote, il est possible d'obtenir une distribution de surfaces de pores et de volume poreux en fonction du diamètre des pores. A partir de la distribution du volume poreux, il est possible de déduire le nombre total de pores pour un diamètre donné, en supposant que chaque pore a la forme d'une sphère. Le nombre total de pores ainsi déduit est de $4,4 \cdot 10^{18}$. Le nombre de molécules de BBT dans la matrice TMOS/APTES est de $2,1 \cdot 10^{16}$.

Estimer le nombre de molécules de BBT par pore équivaut à tirer au sort une sphère incluant x molécules de BBT et à répéter plusieurs fois cette épreuve. Chaque épreuve étant indépendante, le contenu x d'une sphère est indépendant du contenu des sphères voisines. La modélisation du problème revient à utiliser une loi de Poisson de paramètre $n_{\text{moy},i}$ qui décrit la probabilité de présence de x molécules de BBT dans un pore de taille D_i . Cette loi s'exprime selon l'Équation 1.

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

Équation 1 : Loi de Poisson ; $P(x)$ représente la probabilité d'avoir x molécules de BBT dans un pore de taille D_i , et $n_{\text{moy},i}$ est le nombre moyen de molécules de BBT à la surface d'un pore de taille D_i .



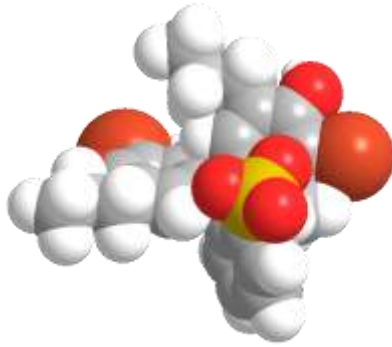


Figure 104. Représentation 3D de la molécule de BBT en modèle éclaté et compact

Le paramètre $n_{moy,i}$ de la loi de Poisson représente le nombre moyen de molécules de BBT à la surface de tous les pores de taille D_i qui sont au nombre de N_i , sachant que l'ensemble du volume tous les pores de taille D_i , V_i , contient n_i molécules de BBT. Le paramètre $n_{moy,i}$ peut être écrit de la façon suivante :

$$n_{moy,i} = \frac{n_i}{N_i} \quad \text{Avec } n_i = \frac{n_{tot} \times V_i}{V_{poreux}} \quad \text{et } N_i = \frac{V_i}{V(\text{sphère } i)}$$

Soit :

$$n_{moy,i} = n_{tot} \frac{V(\text{sphère } i)}{V_{poreux}}$$

La probabilité $P(x)$ peut donc être calculée en utilisant la formule suivante dans laquelle les paramètres D_i et V_{poreux} sont renseignés par l'analyse BET et n_{tot} est connu expérimentalement.

$$P(x) = \frac{\left(n_{tot} \frac{V(\text{sphère } i)}{V_{poreux}}\right)^x e^{-\left(n_{tot} \frac{V(\text{sphère } i)}{V_{poreux}}\right)}}{x!}$$

Les deux termes $P(0)$ et $P(1)$ correspondent à la probabilité d'avoir un pore vide et un pore contenant une molécule de BBT pour une taille D_i de pores. Etant donnée la concentration de BBT, il est peu probable d'avoir deux molécules par pore. Les résultats de ce calcul indiquent que les petits pores de diamètre inférieur à 20 Å sont vides.

D'après les modèles éclaté et compact du BBT, nous avons déterminé les distances interatomiques les plus éloignées (13,3 Å) en tenant compte des rayons de van-der-Waals des atomes de Br et d'H et pu estimer le volume du BBT. Celui-ci serait équivalent à celui d'un cube de 14,9 Å d'arête, soit de $3,31 \cdot 10^{-21} \text{ cm}^3$. Nous avons essayé d'estimer la concentration maximale d'eau que pourrait contenir chaque pore en absence et en présence de BBT. Ce calcul est détaillé dans le Tableau 32.

Le nombre de pores vides et le nombre de pores contenant une molécule de BBT sont donnés respectivement par $Ni^*P(0)$ et $Ni^*P(1)$. Les pores vides peuvent être totalement remplis d'eau alors que les pores contenant le BBT disposent d'un volume poreux libre égal à la différence entre le volume de la sphère et le volume du BBT. Ainsi, le volume disponible pour les molécules d'eau est :

$$V_{dispo}(H_2O) = \sum_{i=8}^{i=70} Ni(vide) * V(sphère i) + Ni(1BBT) * [V(sphère i) - V(BBT)]$$

Sachant qu'une molécule d'eau occupe un volume moléculaire de $2,99 \cdot 10^{-23} \text{ cm}^3$, le nombre de molécules d'eau présentes dans ce volume disponible a été déterminé. Il est égal à $1,99 \cdot 10^2$. Lorsque tous les pores du matériau sont remplis d'eau, la concentration d'eau dans la matrice est égale à :

$$C(H_2O) = \frac{V_{dispo}(H_2O)}{V_{mol}(H_2O) * N_A * V(matrice)} = 23,5 \text{ mol.L}^{-1}$$

La valeur de la concentration d'eau ainsi déterminée est très proche de celle mesurée par pesée de la matrice, lorsque celle-ci est saturée d'eau (25 mol.L^{-1})

Le nombre de molécules d'eau par pore de diamètre i a été calculé :

$$\frac{Ni(H_2O)}{pore} = \frac{V_{dispo}(H_2O)}{V_{mol}(H_2O) * Ni}$$

Ce nombre augmente rapidement avec la taille des pores. Ainsi, pour les pores contenant le BBT, le nombre de molécules d'eau varie de 150 à presque 3000 lorsque le diamètre de la sphère varie de 21 à 70 Å. Dans ces conditions, tous les groupements amine de l'APTES présents dans la matrice peuvent être protonés. Ce résultat est tout à fait en accord avec l'estimation que nous avons faite pour le nombre de molécules d'eau nécessaire (~ 100) pour à la fois établir l'équilibre acido-basique du BBT et protoner les fonctions amine de l'APTES.

La surface spécifique d'adsorption (m^2/g) et les surfaces d'adsorption par catégorie de pores sont également des données expérimentales issues de l'analyse DFT de l'isotherme d'adsorption de N_2 à la température de l'azote liquide. Nous avons essayé d'estimer le nombre de molécules d'eau dans un pore recouvert d'une couche monomoléculaire d'eau et contenant une molécule de BBT. La surface occupée par une molécule d'eau est de $0,106 \text{ nm}^2$ [19]. Ainsi le remplissage d'une couche monomoléculaire d'eau pour les pores de diamètre inférieur ou égal à 20 Å revient à les remplir complètement d'eau.

Tableau 32. Estimation de la concentration maximale d'eau intrapore dans une matrice TMOS/APTES 97/3 dopée de bleu de bromothymol

Di	Volume poreux	Vi	V (sphère i)	Ni	nmoy,i	P(0)	P(1)	Ni(vide)	Ni(1BBT)	Vdispo H ₂ O	Nbre Molécules H ₂ O	Nbre molécules H ₂ O
(A)	(cm ³ /g)	(cm ³)	(cm ³)							(cm ³)	/pore	couche monomoléculaire
8	3,18E-05	1,56E-06	2,68E-22	5,81E+15	0,002496398	0,997506716	0,00249017	5,79E+15	1,45E+13	1,51E-06	9	12
9	1,26E-02	6,20E-04	3,82E-22	1,62E+18	0,003554441	0,996451869	0,00354183	1,62E+18	5,75E+15	6,01E-04	12	16
10	6,77E-03	3,32E-04	5,23E-22	6,34E+17	0,004875776	0,995136091	0,00485206	6,31E+17	3,08E+15	3,22E-04	17	21
11	0,00E+00	0,00E+00	6,97E-22	0,00E+00	0,006489658	0,993531354	0,00644768	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0	0
12	0,00E+00	0,00E+00	9,04E-22	0,00E+00	0,008425342	0,991610052	0,00835465	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0	0
13	0,00E+00	0,00E+00	1,15E-21	0,00E+00	0,010712081	0,989345089	0,01059794	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0	0
14	8,31E-04	4,07E-05	1,44E-21	2,83E+16	0,01337913	0,986709972	0,01320132	2,80E+16	3,74E+14	3,95E-05	47	38
15	5,03E-03	2,46E-04	1,77E-21	1,39E+17	0,016455745	0,983678911	0,01618717	1,37E+17	2,26E+15	2,39E-04	57	45
16	1,29E-02	6,34E-04	2,14E-21	2,96E+17	0,01997118	0,980226923	0,01957629	2,90E+17	5,79E+15	6,15E-04	70	51
17	1,14E-02	5,57E-04	2,57E-21	2,17E+17	0,023954689	0,976329947	0,02338768	2,12E+17	5,07E+15	5,40E-04	83	58
18	5,44E-03	2,67E-04	3,05E-21	8,74E+16	0,028435528	0,971964957	0,02763834	8,50E+16	2,42E+15	2,59E-04	99	64
19	2,73E-03	1,34E-04	3,59E-21	3,73E+16	0,03344295	0,967110083	0,03234301	3,61E+16	1,21E+15	1,30E-04	116	72
20	2,35E-03	1,15E-04	4,19E-21	2,75E+16	0,039006211	0,961744736	0,03751402	2,65E+16	1,03E+15	1,12E-04	136	79
21	6,12E-03	3,00E-04	4,85E-21	6,19E+16	0,045154565	0,955849729	0,04316098	5,91E+16	2,67E+15	2,91E-04	157	51
22	1,34E-02	6,57E-04	5,57E-21	1,18E+17	0,051917267	0,949407411	0,04929064	1,12E+17	5,81E+15	6,37E-04	181	76
23	1,30E-02	6,38E-04	6,37E-21	1,00E+17	0,059323571	0,942401786	0,05590664	9,44E+16	5,60E+15	6,18E-04	206	102
24	1,26E-02	6,19E-04	7,23E-21	8,55E+16	0,067402733	0,934818643	0,06300933	8,00E+16	5,39E+15	6,00E-04	234	114
25	1,68E-02	8,22E-04	8,18E-21	1,00E+17	0,076184006	0,926645682	0,07059558	9,31E+16	7,09E+15	7,96E-04	265	124
26	2,20E-02	1,08E-03	9,20E-21	1,17E+17	0,085696646	0,917872629	0,07865861	1,08E+17	9,22E+15	1,04E-03	298	134
27	1,83E-02	8,99E-04	1,03E-20	8,73E+16	0,095969907	0,908491355	0,08718783	7,93E+16	7,61E+15	8,70E-04	333	144
28	1,79E-02	8,79E-04	1,15E-20	7,65E+16	0,107033043	0,898495983	0,09616876	6,88E+16	7,36E+15	8,50E-04	372	154
29	1,78E-02	8,74E-04	1,28E-20	6,85E+16	0,118915311	0,887882992	0,10558288	6,08E+16	7,23E+15	8,45E-04	412	165
30	1,80E-02	8,82E-04	1,41E-20	6,24E+16	0,131645963	0,876651307	0,11540761	5,47E+16	7,20E+15	8,51E-04	456	177
31	1,90E-02	9,31E-04	1,56E-20	5,97E+16	0,145254255	0,864802385	0,12561623	5,16E+16	7,50E+15	8,97E-04	503	189
32	1,93E-02	9,46E-04	1,71E-20	5,52E+16	0,159769441	0,852340281	0,13617793	4,70E+16	7,51E+15	9,10E-04	552	202
33	1,55E-02	7,58E-04	1,88E-20	4,03E+16	0,175220776	0,839271709	0,14705784	3,38E+16	5,93E+15	7,28E-04	604	215
34	1,23E-02	6,02E-04	2,06E-20	2,92E+16	0,191637516	0,825606084	0,1582171	2,41E+16	4,63E+15	5,76E-04	659	227
35	1,37E-02	6,71E-04	2,24E-20	2,99E+16	0,209048913	0,811355549	0,169613	2,43E+16	5,07E+15	6,41E-04	717	241
36	1,30E-02	6,35E-04	2,44E-20	2,60E+16	0,227484224	0,796534988	0,18119914	2,07E+16	4,72E+15	6,06E-04	778	255
37	1,20E-02	5,86E-04	2,65E-20	2,21E+16	0,246972702	0,781162018	0,19292569	1,73E+16	4,27E+15	5,57E-04	842	270
38	1,08E-02	5,27E-04	2,87E-20	1,83E+16	0,267543602	0,765256963	0,2047396	1,40E+16	3,76E+15	4,99E-04	909	285
39	8,62E-03	4,22E-04	3,10E-20	1,36E+16	0,28922618	0,748842813	0,21658495	1,02E+16	2,95E+15	3,98E-04	978	298
40	9,42E-03	4,62E-04	3,35E-20	1,38E+16	0,312049689	0,731945157	0,22840326	1,01E+16	3,15E+15	4,33E-04	1050	313
41	9,74E-03	4,77E-04	3,61E-20	1,32E+16	0,336043385	0,714592102	0,24013395	9,45E+15	3,18E+15	4,45E-04	1125	332
42	8,47E-03	4,15E-04	3,88E-20	1,07E+16	0,361236522	0,696814167	0,25171473	7,46E+15	2,70E+15	3,85E-04	1202	344
43	7,53E-03	3,69E-04	4,16E-20	8,86E+15	0,387658354	0,67864416	0,26308208	6,01E+15	2,33E+15	3,40E-04	1281	364
44	6,50E-03	3,19E-04	4,46E-20	7,15E+15	0,415338137	0,660117033	0,27417178	4,72E+15	1,96E+15	2,91E-04	1363	381
45	5,43E-03	2,66E-04	4,77E-20	5,57E+15	0,444305124	0,641269724	0,28491942	3,57E+15	1,59E+15	2,41E-04	1446	396

46	4,95E-03	2,42E-04	5,09E-20	4,76E+15	0,474588571	0,62214097	0,29526099	2,96E+15	1,41E+15	2,18E-04	1530	417
47	4,14E-03	2,03E-04	5,43E-20	3,74E+15	0,506217733	0,602771114	0,30513343	2,25E+15	1,14E+15	1,81E-04	1616	434
48	4,00E-03	1,96E-04	5,79E-20	3,38E+15	0,539221863	0,583201887	0,31447521	1,97E+15	1,06E+15	1,72E-04	1703	451
49	3,97E-03	1,95E-04	6,16E-20	3,16E+15	0,573630217	0,56347618	0,32322696	1,78E+15	1,02E+15	1,69E-04	1790	473
50	4,20E-03	2,06E-04	6,54E-20	3,14E+15	0,60947205	0,543637807	0,33133205	1,71E+15	1,04E+15	1,76E-04	1878	485
51	4,10E-03	2,01E-04	6,94E-20	2,89E+15	0,646776615	0,523731246	0,33873712	1,52E+15	9,80E+14	1,70E-04	1965	513
52	3,50E-03	1,71E-04	7,36E-20	2,33E+15	0,685573168	0,503801384	0,34539271	1,17E+15	8,05E+14	1,43E-04	2052	525
53	3,18E-03	1,56E-04	7,79E-20	2,00E+15	0,725890963	0,483893246	0,35125373	9,67E+14	7,02E+14	1,28E-04	2137	555
54	1,36E-03	6,65E-05	8,24E-20	8,07E+14	0,767759255	0,464051726	0,35628001	3,75E+14	2,88E+14	5,36E-05	2221	567
55	1,27E-03	6,23E-05	8,71E-20	7,16E+14	0,811207298	0,444321314	0,36043669	3,18E+14	2,58E+14	4,93E-05	2304	597
56	8,49E-04	4,16E-05	9,19E-20	4,52E+14	0,856264348	0,424745825	0,36369471	1,92E+14	1,65E+14	3,22E-05	2383	610
57	8,18E-04	4,01E-05	9,69E-20	4,14E+14	0,902959658	0,405368131	0,36603107	1,68E+14	1,51E+14	3,04E-05	2460	640
58	6,80E-04	3,33E-05	1,02E-19	3,27E+14	0,951322484	0,386229903	0,36742919	1,26E+14	1,20E+14	2,47E-05	2533	655
59	6,70E-04	3,28E-05	1,07E-19	3,05E+14	1,001382081	0,367371353	0,36787909	1,12E+14	1,12E+14	2,38E-05	2602	686
60	6,27E-04	3,07E-05	1,13E-19	2,72E+14	1,053167702	0,348831004	0,36737755	9,49E+13	9,99E+13	2,17E-05	2667	702
61	6,21E-04	3,04E-05	1,19E-19	2,56E+14	1,106708602	0,330645458	0,36592817	8,47E+13	9,37E+13	2,09E-05	2727	732
62	5,97E-04	2,92E-05	1,25E-19	2,34E+14	1,162034037	0,312849186	0,3635414	7,33E+13	8,52E+13	1,95E-05	2781	745
63	5,97E-04	2,92E-05	1,31E-19	2,23E+14	1,219173261	0,295474346	0,36023442	6,60E+13	8,05E+13	1,89E-05	2830	782
64	4,94E-04	2,42E-05	1,37E-19	1,76E+14	1,278155528	0,278550606	0,356031	4,92E+13	6,28E+13	1,52E-05	2872	796
65	4,73E-04	2,32E-05	1,44E-19	1,61E+14	1,339010093	0,262105	0,35096124	4,23E+13	5,66E+13	1,40E-05	2908	827
66	4,43E-04	2,17E-05	1,50E-19	1,44E+14	1,401766211	0,246161806	0,3450613	3,55E+13	4,98E+13	1,27E-05	2937	854
67	4,04E-04	1,98E-05	1,57E-19	1,26E+14	1,466453137	0,230742447	0,33837299	2,90E+13	4,26E+13	1,11E-05	2958	874
68	4,07E-04	2,00E-05	1,65E-19	1,21E+14	1,533100124	0,215865419	0,3309433	2,62E+13	4,02E+13	1,08E-05	2973	912
69	4,56E-04	2,23E-05	1,72E-19	1,30E+14	1,601736429	0,201546243	0,32282396	2,62E+13	4,20E+13	1,16E-05	2979	923
70	4,56E-04	2,23E-05	1,80E-19	1,24E+14	1,672391304	0,187797447	0,31407082	2,34E+13	3,91E+13	1,11E-05	2978	963
			Nbre de pores tot	4,36E+18						1,99E-02		

Le volume poreux (cm^3/g) et les volumes poreux par catégorie de pores sont des données expérimentales issues de l'analyse DFT de l'isotherme d'adsorption de N_2 à la température de l'azote liquide.

Masse de la matrice = 0,049 g.

$V(\text{matrice}) = \text{Volume de la matrice} = 0,047 \text{ cm}^3$

$V_{\text{poreux}} = \text{volume poreux de la matrice} = 2,254 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^3$

$V(\text{sphère } i) = \text{Volume d'une sphère de diamètre } D_i$

$\text{Nbre de pores vides} = P(0) \cdot N_i$

$\text{Nbre de pores avec 1 BBT} = P(1) \cdot (N_i)$

$V(\text{BBT}) = \text{Volume d'une molécule de BBT} = 3,31 \cdot 10^{-21} \text{ cm}^3$

$\text{Volume disponible} = (\text{Nbre de pores vides}) \cdot V(\text{sphère } i) + (\text{Nbre de pores avec 1 BBT}) \cdot (V(\text{sphère } i) - 3,31 \cdot 10^{-21})$

$V_{\text{mol}}(\text{H}_2\text{O}) = \text{Volume d'une molécule d'eau} = 2,99 \cdot 10^{-23} \text{ cm}^3$

Pour les pores de diamètre compris entre 21 et 70 Å, qui peuvent contenir le BBT, le nombre de molécules d'eau intrapore varie respectivement entre 50 et 960 molécules d'eau, ce qui correspond à des concentrations d'eau par pore allant de 17 à 8,9 mol.L⁻¹. On voit ainsi que le pH intrapore, qui dépend fortement du nombre de molécules d'eau ainsi que de la proportion des groupements SiOH et amine dans un pore donné, n'est pas homogène et que les valeurs de pH mesurées sont des valeurs moyennées sur l'ensemble des pH intrapore.

V. Comparaison avec les données de la littérature

Un grand nombre de travaux de la littérature porte sur des indicateurs de pH à base de colorants encapsulés dans des matrices sol-gel [7], [5], [4]. Ces auteurs ont comparé les propriétés des colorants en solution à celles obtenues lorsque ces colorants sont encapsulés dans des matrices de silicates, inorganiques ou hybrides comportant des surfactants neutres ou ioniques. Dans tous les cas pour cette comparaison, les matrices sous forme de blocs monolithiques ou de films minces ont été trempées dans une solution de pH connu et l'équilibre acido-basique a été étudié par spectroscopie d'absorption après retrait de la matrice du liquide. A notre connaissance, il n'y a pas eu d'étude portant sur la mesure du pH intrapore en fonction de la quantité d'eau adsorbée par une matrice poreuse, les molécules d'eau étant apportées en phase gazeuse.

El-Nahhal et al. ont étudié très récemment les équilibres acido-basiques du BBT dans divers milieux. Le BBT est encapsulé dans une matrice de TMOS ou une matrice hybride de TMOS comportant un surfactant, soit le bromure de cétyltriméthyl ammonium (CTAB) ou le chlorure d'éthanediy-1,2-bis(diméthyl-dodecylammonium) (Gemini 12-2-12) [5]. Ces auteurs observent un déplacement de l'équilibre acido-basique du BBT, lorsque ces matrices sont plongées dans les solutions de pH connu comparativement à celui observé pour le BBT dans les solutions aqueuses et attribuent ces effets à des changements de pKa du BBT. Ainsi, le pKa du BBT en solution aqueuse est de 6,01 et devient égal à 4,01, puis 3,01 et 5,33 lorsque le BBT se trouve respectivement dans une matrice de TMOS sans surfactant, ou avec Gemini 12-2-12 ou avec le CTAB. Ce changement de pKa serait dû à une stabilisation de l'espèce déprotonée et chargée négativement du fait de son interaction avec les têtes polaires (-NH₃⁺) chargées positivement du CTAB ou du Gemini 12-2-12. Cet effet serait beaucoup plus important dans les matrices que lorsque le BBT se trouve en solution avec ces mêmes surfactants. Cette interprétation du shift du pKa des colorants-indicateur de pH en présence de surfactants chargés positivement ou négativement a été proposée depuis très longtemps pour expliquer les variations du domaine de mesure des pH de certains colorants en solution et dès les années 90 dans les matrices sol-gel. Le résultat obtenu par El-Nahhal et al. avec le BBT dans le TMOS est en revanche surprenant, car la déprotonation des groupements résiduels silanol en espèce chargée négativement ne devrait pas contribuer pas à stabiliser le BBT déprotoné. Ce résultat est par ailleurs en désaccord avec les études antérieures du groupe d'Avnir [6] qui trouve que la zone de virage du BBT dans le TMOS, situé entre pH = 5,3 et 7,0 est très proche de celle du BBT en solutions aqueuse entre 6,0 et 7,6.

Avnir et al. [6] ont étudié un grand nombre de colorants indicateur de pH pour lesquels ils trouvent un déplacement de l'équilibre acido-basique quand on passe de la solution à la matrice encapsulant le colorant. Deux colorants, le méthyl orange (MO) et la phénolphtaléine (P), qui ont été étudiés en solutions aqueuses avec et sans surfactant (bromure de cétyltriméthylammonium ou

CTAB) et encapsulés dans des matrices de silicate de 26 mm de diamètre et de 2,5 mm d'épaisseur (TMOS ou TMOS/MeTMOS) en présence de CTAB, ces auteurs ont montré que :

- Les maxima des absorptions des formes acides et basiques subissent un déplacement bathochrome pour la forme basique et hypsochrome pour la forme acide quand on passe d'une solution aqueuse à une solution contenant le CTAB : le bleu de bromothymol subit un déplacement hypsochrome de la longueur d'onde du maximum d'absorption de sa forme acide de 434 nm en solution aqueuse à 420 nm en solution contenant du CTAB et en matrice solide ; le méthyl orange subit également un déplacement hypsochrome de 510 à 508 nm. La phénolphtaléine subit un déplacement bathochrome de 552 à 560 nm.
- Ces modifications de longueur d'onde sont accompagnées de déplacement de la zone de virage des indicateurs : la zone de virage du BBT est déplacée de pH 6-7,6 à pH 5,3-7, la zone de virage du méthyl orange est déplacée de pH 2,9-4,6 à pH 0-2 et celle de la phénolphtaléine est déplacée de pH 8-10 à pH 11,8-14.

Ces modifications sont expliquées par Avnir et al. en termes de localisation spécifique du colorant et de l'interaction entre celui-ci et le surfactant.

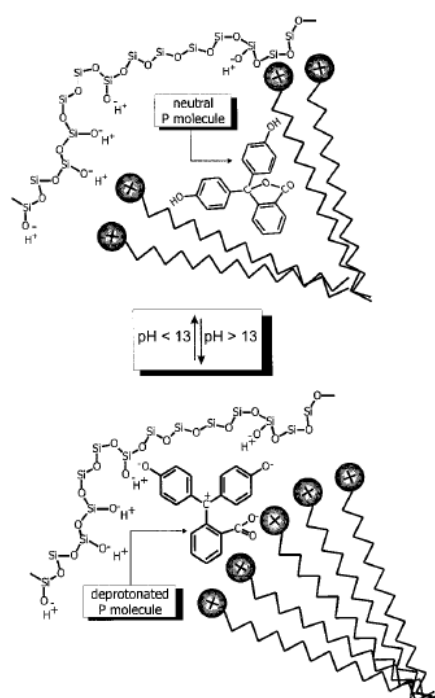


Figure 105. Représentation schématique du déplacement de la phénolphtaléine dans les micelles piégées dans les pores de la matrice de silice en fonction du pH en solution [6].

Le déplacement bathochrome et le déplacement de la zone de virage observés pour la phénolphtaléine sont expliqués de la manière suivante : pour des pH inférieurs à 13, la forme neutre de la molécule prédomine. Fortement hydrophobe, elle se déplace au cœur de la micelle pour interagir avec les chaînes hydrophobes du CTAB. Dans ces conditions, la déprotonation de la phénolphtaléine nécessite des quantités plus importantes de base dans la matrice dopée de CTAB qu'en solution, ce qui expliquerait le décalage de la zone de virage et du pKa vers des valeurs de pH plus élevées. Une fois déprotonée, la phénolphtaléine migre à l'extérieur de la micelle et entre en interaction avec les espèces chargées de la matrice, les groupements silanols résiduels et la tête

cationique du CTAB. En ce qui concerne le BBT, partant d'un pH élevé, le composé est sous forme anionique. Il reste alors localisé à l'interface entre la micelle et la surface du pore, où il est en forte interaction avec les espèces chargées présentes. Dans ces conditions, la quantité d'acide nécessaire à la protonation du BBT est plus importante qu'en solution, ce qui entraîne un décalage de la zone de virage et du pKa vers des pH plus acides.

D'autres travaux rapportent un effet similaire dans des milieux biologiques. Un effet bathochrome, lié à la fixation du BBT sur une protéine, a été montré en 1969. Dans cette étude, Saris montre que la fixation du BBT sur une protéine en milieu tampon Tris-HCl pH 7,6 entraîne une augmentation de la longueur d'onde du maximum d'absorption de la forme basique du BBT de 618 à environ 640 nm, ainsi qu'une diminution de l'absorbance de la bande [20]. Par comparaison avec ces données de la littérature, l'hypothèse que nous avons émise quant à la formation de la paire d'ions [BBTbase, NH₃⁺] entre la molécule de BBT déprotonée et l'APTES protoné, est tout à fait plausible. Dans le présent cas, cette formation serait accompagnée d'une diminution de l'absorbance de la bande de la forme basique du BBT à 620 nm et d'un déplacement hypsochrome important de la transition à plus haute énergie de 390 à 350 nm.

Les études de la littérature ne font pas état du pH intrapore, mais d'une variation de pKa des molécules de colorants en fonction du pH imposé en milieu tamponné. Or, Avnir et al. ont bien mentionné que le pH varie lorsque la solution n'est pas tamponnée [6]. La mesure de solutions non tamponnées de pH inconnu pourrait donc être faussée, si on ne tient pas compte de ce pH intrapore. Nous avons montré que le pH intrapore d'une matrice de TMOS est acide et que sa valeur est de 4,75 pour un pKa(SiOH) égal à ~6,6. De la même façon, des matrices hybrides contenant à la fois des groupements SiOH acides et des groupements amine ont un pH intrapore plus ou moins acide résultant de la proportion de ces groupements et des équilibres acido-basiques correspondants. Nous avons ainsi montré que la matrice TMOS/APTES 97/3 présente un pH intrapore légèrement acide de 6,3 alors que la matrice TMOS/APTES 80/20 qui contient une plus grande proportion de groupements amine a un pH intrapore de 8,15. Avec un tel raisonnement, le pKa du BBT demeure inchangé, mais le domaine de mesure de pH sera différent en fonction de la nature de la matrice poreuse. L'utilisation de sonde de pH à base de matrices inorganiques ou hybrides organique-inorganiques implique donc un étalonnage de pH en milieu non tamponné. De même, pour la mesure de teneurs de CO₂ dans l'air avec des matrices de silicate dopées d'indicateurs de pH, il sera certainement nécessaire de réaliser des courbes d'étalonnage pour la réponse de ces capteurs en fonction de l'humidité du mélange gazeux.

VI. Conclusion

Les études réalisées sur l'adsorption de la vapeur d'eau dans des matrices poreuses inorganiques ou hybrides organique-inorganiques vierges et dopées d'un colorant indicateur de pH, le bleu de bromothymol, nous ont permis de caractériser de nombreuses propriétés dont les caractères hydrophile ou hydrophobe des matrices en fonction de la nature des précurseurs silicés et leur capacité à piéger la vapeur d'eau. Ainsi les matrices TMOS sont les plus hydrophiles et piègent la vapeur d'eau à une vitesse plus élevée que celle des matrices hybrides TMOS/APTES comportant des chaînes aminopropyle hydrophobes. Pour toutes les matrices, la capacité de piégeage de la vapeur d'eau a été reliée au volume poreux et correspond à des concentrations d'eau très élevées pouvant atteindre 25 mol.L⁻¹ lorsque la matrice est saturée d'eau. Les matériaux

comportant essentiellement des micropores tels que le TMOS disposent d'un volume poreux plus petit que ceux des matériaux hybrides qui sont mésoporeux. Nous avons montré qu'il est possible de quantifier à un instant t donné l'eau piégée dans une matrice via une simple mesure de l'absorbance des bandes vibrationnelles dans le proche IR de groupements résiduels SiOH libres ou liés à des agrégats d'eau.

Grâce aux études d'exposition en mode dynamique qui permet un séchage de la matrice in situ sous atmosphère inerte, nous avons pu montrer que lorsque les matrices étaient bien sèches à l'instant $t = 0$, les premières molécules d'eau piégées contribuent dans un premier temps à la solvataion du Bleu de bromothymol avant de solvater les groupements silanol résiduels et les groupements amine de l'APTES dans les pores contenant le colorant. Ces effets sont visibles grâce au déplacement bathochrome de la bande d'absorption du BBT et précèdent les équilibres de déprotonation des groupements silanol et de protonation des groupements amine de l'APTES. Ces derniers équilibres imposent le pH intrapore de la matrice. A partir des équilibres acido-basiques du BBT, nous avons pu déterminer le pH intrapore de chaque matrice. Celui-ci peut ainsi varier de 4,65 à 6,30 et 8,15 de la matrice de TMOS aux matrices hybrides TMOS/APTES 97/3 et 80/20, respectivement. A partir des valeurs de pH intrapore, nous avons pu estimer le pKa des groupements silanol. Celui-ci, d'une valeur de $\sim 6,6$ très proche de celle déterminée par des chercheurs allemands ($6,8 \pm 0,2$) est cependant considérée par quelques équipes comme une valeur moyenne de deux valeurs de pKa (4,9 et 8,5) correspondant à des groupements silanol libres ou liés entre eux par des liaisons-H. L'attribution de l'acidité de ces différents silanol reste cependant controversée. Par ailleurs, sur la base de la valeur de pKa de l'indicateur coloré de pH, nous avons écarté l'hypothèse de l'existence d'un pKa(SiOH) de 8,5.

Un point important des résultats réside dans la notion de pH intrapore lié aux équilibres acido-basiques dus à la présence simultanée de groupements acides (SiOH) déprotonables et de groupement basiques (aminopropyle) protonables. Or le pH intrapore n'est pas évoqué dans la littérature pour expliquer les changements de domaine d'activité des indicateurs colorés de pH. Beaucoup d'équipes envisagent une variation de pKa de l'indicateur en invoquant l'interaction privilégié de type électrostatique ou par liaison-H entre le colorant et les espèces chargées et groupement SiOH présents à la surface des pores ou incorporées dans les pores. Ce point a été discuté et étayé avec les résultats obtenus. Nous avons montré que ce pH intrapore pouvait augmenter de 4,75 à 6,3 et 8,15 respectivement pour les matrices acides de TMOS et celles incorporant des groupements amine en proportion croissante. Nous avons également montré que ce pH intrapore pouvait aussi évoluer lors de la dissolution de CO_2 gazeux dans la matrice. L'acidification d'une matrice par l'acide carbonique est cependant mineure comparativement à celle induite par la déprotonation des groupements silanol. Ces données ont été prises en compte par la suite pour l'élaboration des films minces nanoporeux dopés de $\text{Tb}(\text{NO}_3)_3$. Les matrices sont dans ce cas produites à partir d'un sol tamponné à un pH de 6,4.

Avec la connaissance des distributions de tailles des pores en surface et en volume des matrices poreuses, obtenues expérimentalement à partir d'isothermes d'adsorption de N_2 à la température de l'azote liquide, nous avons également pu estimer le nombre de molécules d'eau présentes dans les pores vides et dans les pores pouvant contenir une grosse molécule comme le BBT. Ce calcul montre que le nombre de molécules d'eau, de 150 à 3000 molécules par pore selon la taille des pores, est suffisamment élevé pour permettre la déprotonation des groupements SiOH, la

protonation des groupements amine de l'APTES et la stabilisation des espèces chargées pour l'établissement du pH intrapore.

Les résultats que nous avons obtenus sont particulièrement pertinents pour l'application des matrices nanoporeuses de silicates pour l'élaboration de capteurs de composés organiques volatils, l'eau étant l'interférent majeur pour ces capteurs.

Bibliographie

1. Phillips, M., et al., *Variation in volatile organic compounds in the breath of normal humans*. Journal of Chromatography B, 1999. **729**(1-2): p. 75-88.
2. Rich, P., *Why measure carbon dioxide inside buildings?* 2013: p. 4.
3. El Nahhal, I.M., et al., *Sol-gel encapsulation of cresol red in presence of surfactants*. Journal of Sol-Gel Science and Technology, 2012. **62**(2): p. 117-125.
4. Zaggout, F.R., et al., *Encapsulation of methyl orange pH-indicator into a sol-gel matrix*. Materials Letters, 2005. **59**(23): p. 2928-2931.
5. El-Nahhal, I.M., et al., *Sol-gel encapsulation of bromothymol blue pH indicator in presence of Gemini 12-2-12 surfactant*. Journal of Sol-Gel Science and Technology, 2014. **71**(1): p. 16-23.
6. Rottman, C., et al., *Surfactant-induced modification of dopants reactivity in sol-gel matrixes*. Journal of the American Chemical Society, 1999. **121**(37): p. 8533-8543.
7. El Nahhal, I.M., S.M. Zourab, and F.S. Kodeh, *Encapsulation of Bromothymol Blue into a Polysiloxane Network Matrix in Presence of Surfactants*. Journal of Dispersion Science and Technology, 2011. **32**(9): p. 1367-1370.
8. Shapovalov, S.A., *Interaction of sulfophthaleine anions with cationic dyes in aqueous solution*. Russian Journal of General Chemistry, 2010. **80**(5): p. 953-963.
9. Wood, D.L., et al., *Preparation of high silica glasses from colloidal gels. 3. Infrared spectrophotometric studies*. Journal of the American Ceramic Society, 1983. **66**(10): p. 693-699.
10. Calvo-Munoz, M.L., et al., *Chemical sensors of monocyclic aromatic hydrocarbons based on sol-gel materials: synthesis, structural characterization and molecular interactions*. Journal of Materials Chemistry, 2002. **12**(3): p. 461-467.
11. Schindler, P.W., Kamber, H.R., Die aciditat von silanolgruppen, *helvetica chimica*, 51, 1781
12. Allen, L.H., Matijevi.E, and L. Meties, *Exchange of Na+ for silanolic protons of silica*. Journal of Inorganic & Nuclear Chemistry, 1971. **33**(5): p. 1293-&.
13. Ong, S.W., X.L. Zhao, and K.B. Eissenthal, *Polarization of water molecules at a charged interface - 2nd harmonic studies of the silica-water interface*. Chemical Physics Letters, 1992. **191**(3-4): p. 327-335.
14. Fan, H.F., et al., *Characterization of two types of silanol groups on fused-silica surfaces using evanescent-wave cavity ring-down spectroscopy*. Analytical Chemistry, 2007. **79**(10): p. 3654-3661.
15. Sulpizi, M., M.P. Gaigeot, and M. Sprik, *The Silica-Water Interface: How the Silanols Determine the Surface Acidity and Modulate the Water Properties*. Journal of Chemical Theory and Computation, 2012. **8**(3): p. 1037-1047.
16. Leung, K., I.M.B. Nielsen, and L. Criscenti, *Elucidating the bimodal acid-base behavior of the water-silica interface from first principles*. *Geochimica Et Cosmochimica Acta*, 2010. **74**(12): p. A584-A584.
17. Calvo-Munoz, M.L., T.T. Truong, and T.H. Tran-Thi, *Chemical sensors of monocyclic aromatic hydrocarbons based on sol-gel materials: kinetics of trapping of the pollutants and sensitivity of the sensor*. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 2002. **87**(1): p. 173-183.
18. Kim, Y.J., *Phage assembly using APTES-conjugation of major Coat p8 Protein for possible scaffolds*. *Interdisciplinary bio central*, 2012. **4**(9): p. 1-7.
19. Livingston, H.K., *The cross sectional areas of molecules adsorbed on solid surfaces*. . Journal of Colloid Science, 1949. **4**(5): p. 447-458.
20. Saris, N.E.L. and A.J. Seppala, *Binding of bromothymol blue by mitochondrial structural protein*. . *European Journal of Biochemistry*, 1969. **7**(2): p. 267-&.

CHAPITRE IV

Expositions des matrices nanoporeuses dopées de Tb(III) aux vapeurs d'acide nicotinique

I. Introduction

Les travaux précédents ont permis de montrer l'influence du dioxyde de carbone et de la vapeur d'eau, deux constituants abondants de l'haleine, sur les propriétés physico-chimiques des matrices, et notamment sur le pH intrapore. De même, les études réalisées en solution indiquent que la complexation de l'acide nicotinique avec l'ion Tb^{3+} est améliorée dans les milieux à pH légèrement acide, proches de la neutralité. Sur la base de ces résultats, les matrices élaborées pour capter et mesurer l'acide nicotinique sont réalisées en milieu tamponné à pH égal à 6,4.

Dans ce chapitre nous décrivons la synthèse de deux types de matériaux, des blocs monolithiques et des films minces dopés de $Tb(NO_3)_3$ et déposés sur des substrats de quartz et nous étudierons leurs expositions à des vapeurs d'acide nicotinique. Une étape essentielle est la génération de mélanges gazeux calibrés d'acide nicotinique réalisée à partir d'un mode d'extraction gaz/liquide et optimisée en fonction de divers paramètres.

Divers modes d'exposition statiques et dynamiques seront exploités pour la détection de l'acide nicotinique via la mesure de luminescence de Tb^{3+} . Ces études sont complétées avec des mesures de durée de vie de luminescence de Tb^{3+} en milieu solide confiné en absence et en présence d'acide nicotinique. De même, d'autres études d'interférence seront menées avec des expositions à la vapeur d'eau présente en grande quantité dans l'haleine et au nicotinate de méthyle souvent conjointement présent avec l'acide nicotinique.

II. Préparation des matrices nanoporeuses dopées de terbium

II.1 Préparation des monolithes

Les monolithes ont été préparés dans des moules en polypropylène contenant 350 cavités de dimensions $16 \times 10 \times 2$ mm. Un volume de 50 mL de sol a été utilisé pour la préparation des matrices, ce qui a permis d'obtenir 156 monolithes. Des matrices vierges et des matrices dopées de nitrate de terbium ont été préparées. La concentration de nitrate de terbium dans le sol a été fixée à 1 mmol.L^{-1} . Le sol était composé de TMOS, d'APTES de méthanol et d'eau dans des proportions molaires 0,97/0,03/5/4. Les volumes des réactifs sont répertoriés dans le Tableau 33.

La quantité d'eau totale provient des 5 mL de solution de Tb^{3+} tamponnée à l'hexamine et des 3,461 mL d'eau déminéralisée. La synthèse a été effectuée dans un bain thermostaté à basse température (-20°C). Les réactifs sont introduits dans l'ordre suivant et le sol est agité de manière continu:

- méthanol

- TMOS
- APTES
- eau et solution aqueuse de Tb^{3+} tamponnée à l'hexamine.

Tableau 33. Volume de réactifs utilisés pour la préparation des monolithes

	Volume mL	Concentration dans le Sol mol.L ⁻¹
TMOS	16,942	2,277
APTES	0,824	0,07
Méthanol	23,773	11,738
Solution aqueuse d'hexamine 1,4 mol.L⁻¹ + $Tb(NO_3)_3$ 10⁻² mol.L⁻¹	5,0	HX: 0,14 Tb^{3+} : 10 ⁻³
Eau total	8,461	9,391

Le sol est versé dans le moule qui est recouvert avec une membrane aluminium pour une maturation pendant 4 jours. Au bout des 4 jours, la membrane d'aluminium est remplacée par une membrane poreuse qui permet l'évaporation des solvants. Le séchage dure encore trois semaines à température ambiante au bout desquelles on obtient des monolithes secs de volume réduit. Le coefficient de rétractation du volume est de 6,24. La concentration de nitrate de terbium dans les monolithes est alors de 6,24 mmol.L⁻¹. La figure suivante montre les matrices hybrides transparentes, dopées à $Tb(NO_3)_3$ et à l'hexamine.

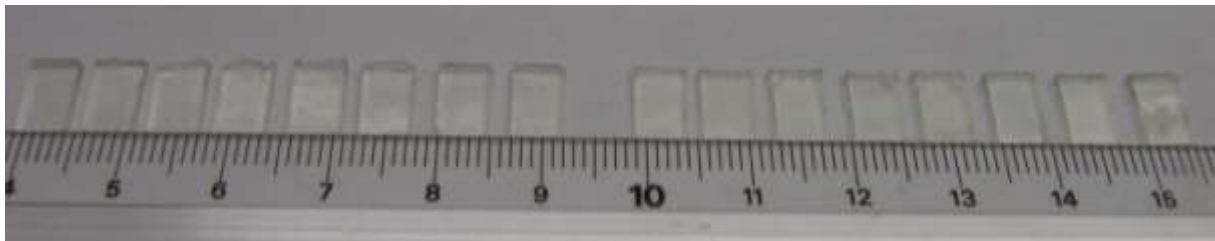


Figure 106. Matrices TMOS/APTES 97/3 dopées d'hexamine 0,87 mol.L⁻¹ et de $Tb(NO_3)_3$ 6,24 10⁻³ mol.L⁻¹.

La porosité des matrices TMOS/APTES 97/3 dopées d'hexamine et de $Tb(NO_3)_3$ est similaire à celle que nous avons obtenue pour les autres matrices TMOS/APTES 97/3. Les angles de contact mesurés varient entre 25 et 40 degrés avec une moyenne de 36 degrés.

II.2 Préparation des couches minces

Des couches minces ont été déposées par spin coating sur des lames de quartz de dimensions 8*5*1 mm. La surface des lames de quartz est traitée par exposition à l'ozone pendant 15 minutes avant le dépôt. Le sol de départ est composé de TMOS/APTES/MeOH/eau dans des rapports molaires 0,97/0,03/5/4. L'eau « totale » provient de la solution aqueuse de $Tb(NO_3)_3$ et de la solution aqueuse d'hexamine. Les volumes de réactifs pour la préparation de 2 mL de sol sont indiqués dans le Tableau 34.

Tableau 34. Volume des réactifs pour la préparation des couches minces

Composition du sol	Volume, mL	Concentration, mol.L ⁻¹
TMOS	0,678	2,277
APTES	0,033	0,07
Méthanol	0,951	11,738
Solution aqueuse de Tb(NO ₃) ₃ 5,8 10 ⁻² mol.L ⁻¹	0,138	4 10 ⁻³
Solution aqueuse d'hexamine 1,4 mol.L ⁻¹	0,200	0,14
Eau total	0,338	9,391

La synthèse est effectuée dans un flacon de 10 mL thermostaté à -15°C. L'ajout des réactifs suit l'ordre suivant, le sol étant agité en continu :

- Méthanol
- TMOS
- APTES
- Eau totale

Le dépôt est réalisé à la tournette après 7 minutes de maturation du sol. Un volume de 15 µL est utilisé pour le dépôt du film mince. Les paramètres de rotation du spin coater sont résumés dans le Tableau 35.

Tableau 35. Paramètres de rotation du spin coater.

Step	Durée, s	Accélération, rpm.s ⁻¹	Vitesse max, rpm.min ⁻¹
1	30	500	4000
2	4	500	5000



Figure 107. Film mince dopé de nitrate de terbium déposé sur lame de quartz par spin coating selon les conditions décrites dans le tableau 33.

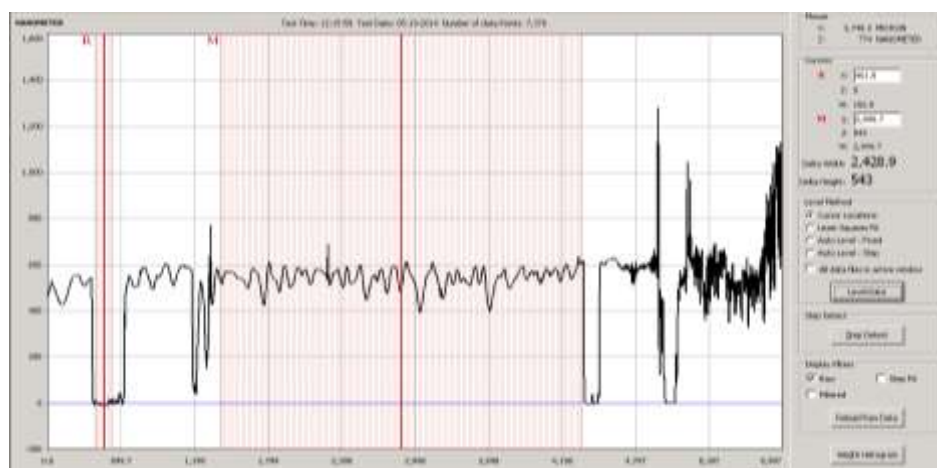


Figure 108. Mesure profilométrique de l'épaisseur et de la morphologie de surface du film.

La Figure 107 montre un film dopé de nitrate de terbium déposé sur une lame de quartz par spin coating. Le film est globalement transparent mais ne recouvre pas totalement la lame de quartz. Ce phénomène est dû au dépôt d'un sol à basse température sur un substrat à température ambiante, ce qui raccourcit le temps de gélification. Les couches minces ont été caractérisées par profilométrie pour déterminer les épaisseurs et l'état de leur surface.

La mesure du profil indique que le film est globalement plan et régulier avec la présence de rugosités à la surface. Les valeurs d'épaisseur mesurées sont répertoriées dans le Tableau 36.

Tableau 36. Mesures d'épaisseur des films nanoporeux par profilométrie.

	Film 1	Film 2	Film 3	Film 4	Film 5	moyenne	σ
1 ^{re} mesure, nm	543	512	636	673	695	613	67
2 ^e mesure, nm	679	653	632	577	534		

Les films ont une épaisseur moyenne de l'ordre de 613 ± 67 nm. La concentration de nitrate de terbium dans le film peut être déduite de celle dans le sol (4 mmol.L^{-1}) en tenant compte du coefficient de rétractation volumique de 6,24 mesuré pour les monolithes de formulation identique. En supposant que la rétractation est la même pour les monolithes et les couches minces, mais dans une seule direction correspondant à l'épaisseur du film, la concentration de Tb^{3+} dans les couches minces peut être évaluée à 25 mmol.L^{-1} .

Avant d'exposer les matrices et les films à de la vapeur d'acide nicotinique, nous avons tout d'abord mis au point un dispositif de génération de mélanges gazeux calibrés en acide nicotinique.

III. Génération de mélanges gazeux calibrés d'acide nicotinique.

Comme nous l'avons vu au chapitre I, l'acide nicotinique est très peu volatil à température ambiante à l'état solide et à partir de solutions aqueuses. Pour cette raison, l'obtention de mélanges gazeux en fortes concentrations de ce composé est une tâche difficile. Les mélanges gazeux d'acide nicotinique ont été générés suivant deux modes : la perméation et l'extraction liquide-gaz.

III.1 Génération par perméation de gaz

La génération gazeuse par perméation repose sur l'utilisation de tube à perméation contenant de l'acide nicotinique. Le tube à perméation recouvert d'une membrane perméable aux vapeurs d'acide nicotinique, est disposé dans un four. Le four est chauffé et la quantité de vapeurs d'acide nicotinique traversant la membrane par unité de temps est appelé taux de perméation. Ce dernier dépend de la température. L'acide nicotinique étant très peu volatil, il a été nécessaire de chauffer le tube à 100°C pour l'obtention d'un bon taux de perméation. Le four est balayé avec un flux d'azote dont le débit est de 80 mL.min^{-1} . La teneur d'acide nicotinique attendue dans le mélange gazeux mère est dans ce cas de 5,7 ppm et peut être diluée avec le banc à dilution. Les détails du dispositif et les photos de ces éléments sont montrées dans l'annexe du chapitre IV.

Les premiers tests de génération d'acide nicotinique gazeux ont été menés en mesurant la quantité d'acide nicotinique générée directement en sortie du four à perméation. Le flux gazeux en sortie du four est barboté dans un flacon de 10 mL contenant une solution aqueuse d'acide chlorhydrique $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ ou une solution aqueuse de phosphate de potassium tamponnée à pH 10

pour mesurer directement l'acide nicotinique sous sa forme acide ou basique par son absorbance dans l'UV. Pour optimiser la mesure, la durée de bullage était d'une dizaine d'heures. Ces tests ne se sont pas révélés concluants. En effet, l'acide nicotinique généré dans la chambre de perméation du four à 100°C condense dès la sortie de celle-ci comme montré sur la Figure 109.



Figure 109. Tuyau bouché par la recondensation de l'acide nicotinique à la sortie de la chambre de perméation du four.

Le chauffage du circuit fluide avec des rubans chauffant à 90°C réduit cette condensation mais pas entièrement. Les spectres d'absorption des solutions de dosage de l'acide nicotinique sont présentés dans la figure 110.

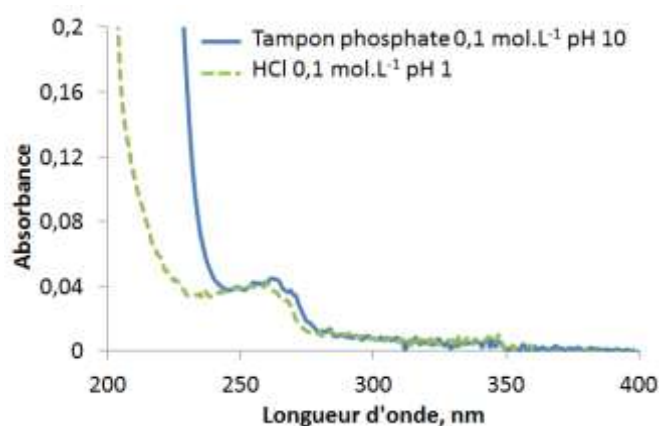


Figure 110. Spectre d'absorption de l'acide nicotinique récupéré en sortie du four à perméation dans une solution acide et dans une solution basique. Durée de bullage : 932 min dans la solution d'acide 0,1 mol.L⁻¹ et 927 min dans la solution de phosphate de potassium tamponnée à pH 10. Débit de gaz : 80 mL.min⁻¹.

En supposant que tout l'acide nicotinique présent dans le flux gazeux s'est totalement dissous dans la solution, on trouve une teneur d'acide nicotinique égal à 61 ppb¹⁶ très faible devant celle attendue de 5,7 ppm. L'acide nicotinique est probablement resté piégé à des points froids de l'installation.

La génération de mélanges gazeux calibrés d'acide nicotinique à des teneurs plus fortes ou plus faibles semble donc compromise par cette méthode. Pour de faibles teneurs, le flux gazeux en sortie de four doit être dilué au moyen d'un banc de dilution constitué de régulateurs de débit massique. Or, ces appareils ne peuvent pas être chauffés à plus de 70°C. A cette température, une partie de l'acide nicotinique risque d'être déposé sous forme de solide dans les tuyaux. Nous avons donc choisi de procéder à la génération de vapeurs d'acide nicotinique en utilisant une autre méthode.

¹⁶ Le calcul est effectué en supposant que tout l'acide nicotinique est dissous dans la solution tamponnée à pH 10 : $[AN]_s = \text{Abs}(260\text{nm})/\epsilon(260\text{ nm}).l = 1,48 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$; le nombre de mole, $n(AN)_s = [AN]_s \cdot V_s = 1,48 \cdot 10^{-9} \text{ mole}$; le débit molaire d'AN, $\text{débit}(AN) = 1,6 \cdot 10^{-10} \text{ mol.min}^{-1}$; le débit molaire du gaz vecteur à 100°C étant de $2,6 \cdot 10^{-3} \text{ mol.min}^{-1}$, la teneur d'AN est de 61 ppb.

III.2 Génération par extraction gaz-liquide

La génération de vapeurs d'acide nicotinique par extraction liquide-gaz consiste à faire percoler une solution aqueuse enrichie en acide nicotinique dans une colonne de strippage et à extirper la fraction volatile par un flux de gaz inerte. Le schéma de l'installation est présenté dans Figure 111.

La colonne de strippage est une colonne de verre borosilicaté de 1 m de long et 18,4 mm de diamètre. Elle est garnie d'anneaux de Raschig en verre (6,55 mm de diamètre extérieur, 4,2 mm de diamètre intérieur et 6,6 mm de long) destinés à augmenter la surface d'échange entre le gaz et la solution. La colonne est entourée de rubans chauffants pour favoriser le passage de l'acide nicotinique en phase gazeuse. Les rubans chauffants sont branchés à un potentiostat permettant ainsi de régler la température de chauffage en fonction.

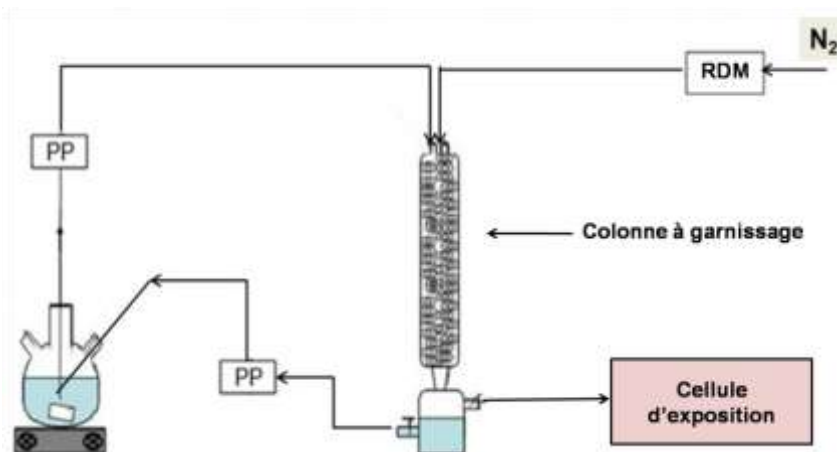


Figure 111. Schéma du montage de génération d'acide nicotinique à partir de solution aqueuse

Une solution saturée d'acide nicotinique est utilisée pour générer les vapeurs d'acide nicotinique. La solution mère est contenue dans un ballon à fond plat en verre borosilicaté de 6 L de volume. Un volume de solution est injecté dans la colonne de strippage avec un débit de $10 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

Le gaz vecteur utilisé est de l'azote généré par un générateur d'azote Domnick Hunter. Le débit de gaz vecteur est contrôlé par un régulateur de débit massique de marque Bronckhorst d'un débit maximal de $2 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$. Un flacon de récupération en verre, de 18,4 cm de diamètre et de 25,5 cm de hauteur est installé au pied de la colonne. La solution circule en circuit fermé par injection de la solution récupérée en sortie de la colonne à garnissage dans le flacon initial de solution mère. La circulation de la solution est assurée par des pompes péristaltiques de marque FMI modèle QG 150. Le débit de solution en entrée de la colonne est de $10 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Les pompes péristaltiques sont reliées à la colonne et au flacon de récupération par des tuyaux en polypropylène d'un diamètre intérieur de 6 mm. La cellule d'exposition utilisée est une enceinte en verre borosilicaté.

III.2.1 Optimisation de la méthode

Pour optimiser le rendement du dispositif de génération de mélanges gazeux d'acide nicotinique, nous avons étudié l'influence de la température de chauffage de la colonne et celle du débit de gaz vecteur. Nous avons utilisé une solution aqueuse saturée d'acide nicotinique (solubilité dans l'eau : $18 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ soit $0,146 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ à 25°C).

III.2.2 Choix du débit de gaz vecteur

L'influence du débit de balayage d'azote a été étudiée. Des débits de gaz vecteur de 100, 200, 300, 400 et 800 mL.min⁻¹ ont été testés. La température de chauffage de la colonne de strippage est dans cette étude maintenue constante à 70°C. Le flux gazeux de sortie barbote dans un volume de solution initialement égal à 5 mL. Après une durée du bullage de 60 minutes, ce volume augmente légèrement dû à l'apport de vapeur d'eau qui se condense. Les données et les calculs de concentration d'acide nicotinique sont collectés dans le

La figure 112 présente l'évolution de la concentration d'acide nicotinique gazeux en fonction du débit de gaz vecteur. Un exemple de calcul est donné en bas de page¹⁷. La concentration gazeuse d'acide nicotinique en fonction du débit de gaz vecteur suit une évolution en cloche, avec une portion linéaire croissante entre 200 et 400 mL.min⁻¹. Sur la base de ces données, le choix du débit gazeux a été fixé à 400 mL.min⁻¹ pour la suite des études.

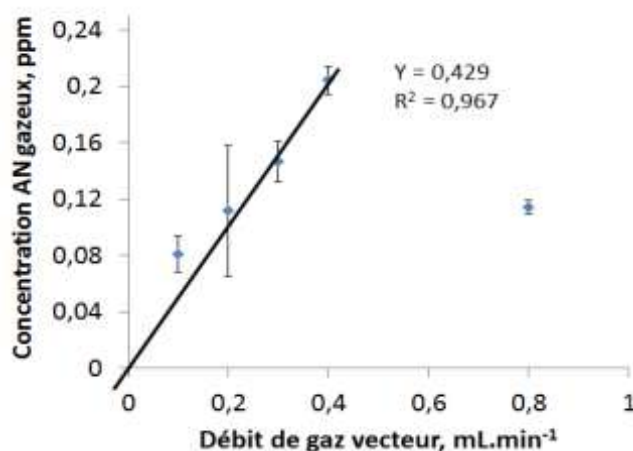


Figure 112. Concentration d'acide nicotinique dans le flux gazeux en fonction du débit de gaz vecteur. Durée de bullage : 60 minutes, température de la colonne de strippage : 70°C

Tableau 37. Concentration d'acide nicotinique dans le flux gazeux en fonction du débit de gaz vecteur. T°C : 70°C, durée de bullage : 60 minutes.

Débit d'azote, L.min ⁻¹	Absorbance	écart-type	[AN] _{aqueux} , mol.L ⁻¹	Volume de solution, mL	[AN] _{gaz} ppm	écart-type
0,1	0,008	0,002	2,85E-06	5,4	0,081	0,013
0,2	0,020	0,010	7,31E-06	5,6	0,112	0,047
0,3	0,034	0,005	1,24E-05	6,2	0,147	0,014
0,4	0,063	0,004	2,26E-05	6,3	0,205	0,010
0,8	0,051	0,003	1,83E-05	7,3	0,114	0,005

¹⁷ Exemple de calcul de la concentration gazeuse d'acide nicotinique pour une colonne chauffée à 70°C et un temps de bullage de 60 min avec un flux gazeux de 400 mL.min⁻¹. le gaz enrichi en acide nicotinique est bullé dans 5 mL d'une solution tamponnée de phosphate de potassium 0,1 mol.L⁻¹ à pH 7,6. Au bout de 60 min, le volume de la solution a augmenté à 6,3 mL du fait de l'apport d'humidité du flux gazeux. A ce pH, l'acide nicotinique est totalement dissous dans la solution sous forme d'ions nicotinate. La connaissance des valeurs de l'absorbance (Abs= 0,062) et du coefficient d'absorption de l'ion nicotinate dans la solution tampon ($\epsilon(260 \text{ nm}) = 2760 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) permet de calculer la concentration d'ions nicotinate dans la solution. Elle est égale à $2,26.10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$. En supposant que la masse volumique de la solution est identique à celle de l'eau, il est possible de calculer le nombre de moles d'ions nicotinate dans la solution : $1,4.10^{-7} \text{ mole}$ et de déduire le nombre de mole d'acide nicotinique dans le volume gazeux en tenant compte du facteur de dilution : $1,75.10^{-7} \text{ mole}$. En divisant cette valeur par la durée de bullage (60 min.), nous obtenons un débit molaire d'acide nicotinique gazeux de $2,92.10^{-9} \text{ mol.min}^{-1}$. En calculant le débit molaire de gaz vecteur ($1,487 \cdot 10^{-2} \text{ mol.min}^{-1}$ à 328°K) et en faisant le rapport entre le débit molaire d'acide nicotinique et le débit molaire de gaz vecteur, nous obtenons la proportion d'acide nicotinique dans le mélange gazeux, exprimée ici en ppm : 0,206 ppm.

III.2.3 Choix de la température de chauffage

Nous avons ensuite testé différentes températures de chauffage plus faibles que 70°C pour tester l'efficacité du mode de strippage. La Figure 113 montre que l'abaissement de température induit une diminution importante du rendement de strippage.

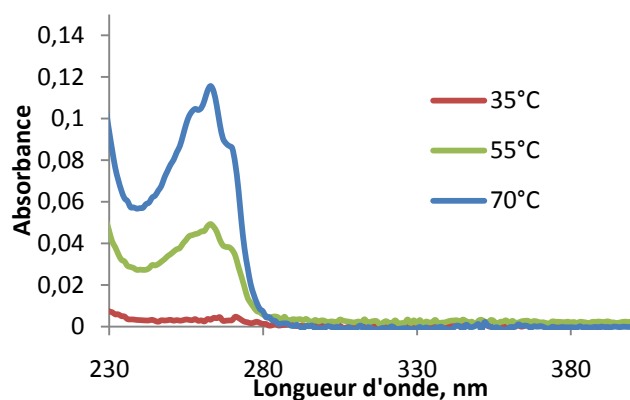


Figure 113. Spectres d'absorption de la solution de récupération en fonction de la température de chauffage de la colonne. Débit de gaz : 400 mL.min⁻¹. Durée de bullage : 120 min. Tampon phosphate 0,1 mol.L⁻¹ pH 7,6.

Les données collectées dans le tableau 38 permettent de déduire la concentration de l'acide nicotinique dans la phase gazeuse. La figure 114 montre l'évolution de la teneur d'acide nicotinique dans le mélange gazeux pour différentes températures de chauffage de la colonne.

Tableau 38. Valeurs de concentrations d'acide nicotinique dans la solution de bullage et dans le flux gazeux en fonction de la température de chauffage.

T °C	Absorbance à 260 nm	Volume de solution (mL)	[AN] _{liquide} , mol.L ⁻¹	[AN] _{gazeux} , ppm	écart-type
35	0,0030	5,9	1,10E-06	0,004	0,003
55	0,046	6,6	1,66E-05	0,081	0,002
70	0,105	7,7	3,81E-05	0,265	0,016

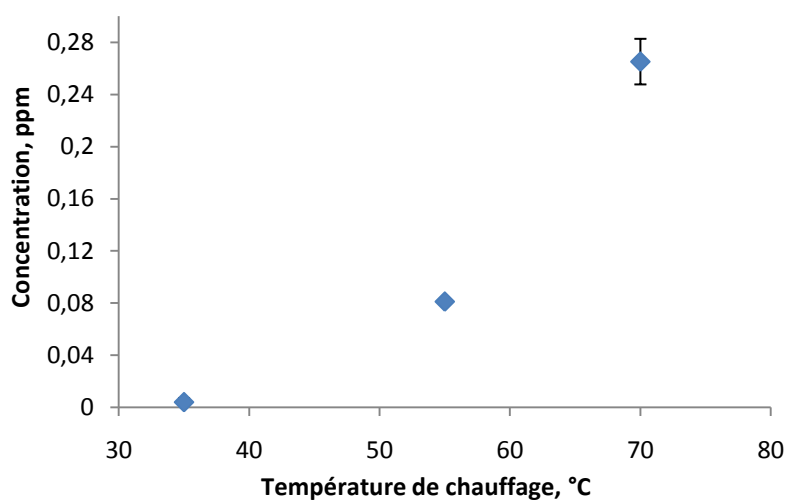


Figure 114. Concentration d'acide nicotinique dans le flux gazeux en fonction de la température de chauffage. Durée de bullage : 120 minutes, débit de bullage : 400 mL.min⁻¹

On retrouve bien la même valeur de concentration lorsque la colonne est chauffée à 70°C, valeur correspondant au meilleur rendement de strippage. Sur la base de ces résultats, les études suivantes ont été réalisées en chauffant la colonne à 70°C.

III.2.4 Choix de la durée de bullage

Deux durées de bullage de 60 et 120 min ont été testées. L'absorbance de la solution de récupération après un bullage de 120 et de 60 minutes est respectivement de 0,107 et de 0,062.

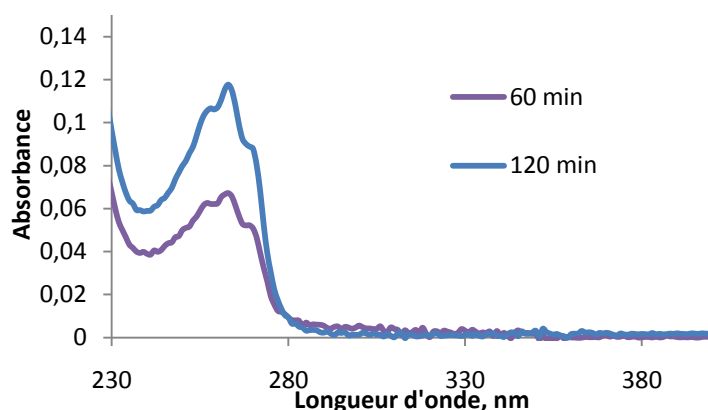


Figure 115. Spectres d'absorption de la solution de récupération après bullage de vapeurs d'acide nicotinique aqueux pendant 60 et 120 minutes. Débit de gaz vecteur : 400 mL.min⁻¹, température de chauffage : 70°C.

Les concentrations correspondantes d'acide nicotinique dans le flux gazeux sont respectivement de 205 ppb et de 260 ppb. L'écart relatif entre ces valeurs est étant de 22 %. Ces résultats montrent qu'un temps de bullage de 60 minutes est suffisant pour permettre l'estimation de la concentration gazeuse d'acide nicotinique lorsque le rendement de strippage est le meilleur avec une colonne chauffée à 70°C.

IV. Exposition de matrices à de l'acide nicotinique gazeux

Deux modes d'exposition statique et dynamique ont été réalisés. Nous rappelons que les paramètres d'acquisition de la luminescence de Tb³⁺ ont été adaptés à l'étude de couches minces. Après excitation à 260 nm, la luminescence est collectée entre 530 et 570 nm avec un angle de 45°C par rapport à la direction de l'excitation. Les fentes d'excitation et d'émission étaient réglées à 15 et 10 nm respectivement pour la collecte de la luminescence de couches minces. Elles étaient fixées à 5 et 2 nm pour la collecte de la luminescence des monolithes.

IV.1 Exposition statique des matrices monolithiques dopées de Tb(NO₃)₃ et d'hexamine

IV.1.1 Mesures des intensités d'émission

Pour comprendre les effets décorrés de l'eau et de l'acide nicotinique sur la luminescence de Tb³⁺ dans les matrices nanoporeuses, des études d'exposition ont été entreprises avec de la vapeur d'acide nicotinique pur, puis avec de la vapeur d'eau saturante.

Des monolithes de 1 mm d'épaisseur vierges et dopés de nitrate de terbium à une concentration de 6,24 mmol.L⁻¹ ont été exposés aux vapeurs générées par 50 mg d'acide nicotinique pur et à de la vapeur d'eau saturante avec le dispositif décrit dans le chapitre III (voir Figure 71). La durée d'exposition a été variée entre plusieurs heures et 21 jours. Les spectres d'absorption UV-visible des matrices avant et après exposition ont été collectés et sont présentés dans la Figure 116.

Les spectres d'absorption des monolithes présentent deux bandes d'absorption centrées à 263 et 303 nm, attribuables respectivement à l'acide nicotinique et à Tb^{3+} . La bande d'absorption de l'acide nicotinique est très intense après trois semaines d'exposition de la matrice aux vapeurs d'acide nicotinique pur. En supposant que le coefficient d'absorption de l'acide nicotinique dans la matrice est identique à celui calculé en solution ($2970 \pm 150 M^{-1}.cm^{-1}$), la concentration d'acide nicotinique piégé dans le monolithe peut être calculée. Elle serait d'environ $2,4 mmol.L^{-1}$ dans le monolithe, ce qui correspondrait à une moyenne de 1 molécule d'AN pour $2,6 Tb^{3+}$, $7,8 NO_3^-$ et environ 360 molécules d'hexamine. Cette distribution laisse à prévoir la présence de complexes de type $Tb(Hexamine)_3(NO_3)(H_2O)$ et $Tb(Hexamine)_4(H_2O)$ dans les pores mais également la présence de molécules d'hexamine libres dans d'autres pores, puisque ces dernières sont en large excès. Rappelons également qu'avec une matrice TMOS/APTES 97/3, la concentration de groupements aminopropyle est de $0,47 mol.L^{-1}$ et celle estimée de groupements SiOH résiduels est $1,37 mol.L^{-1}$. Comparativement à la concentration de Tb(III), celles-ci sont respectivement 75 et 220 fois plus élevées.

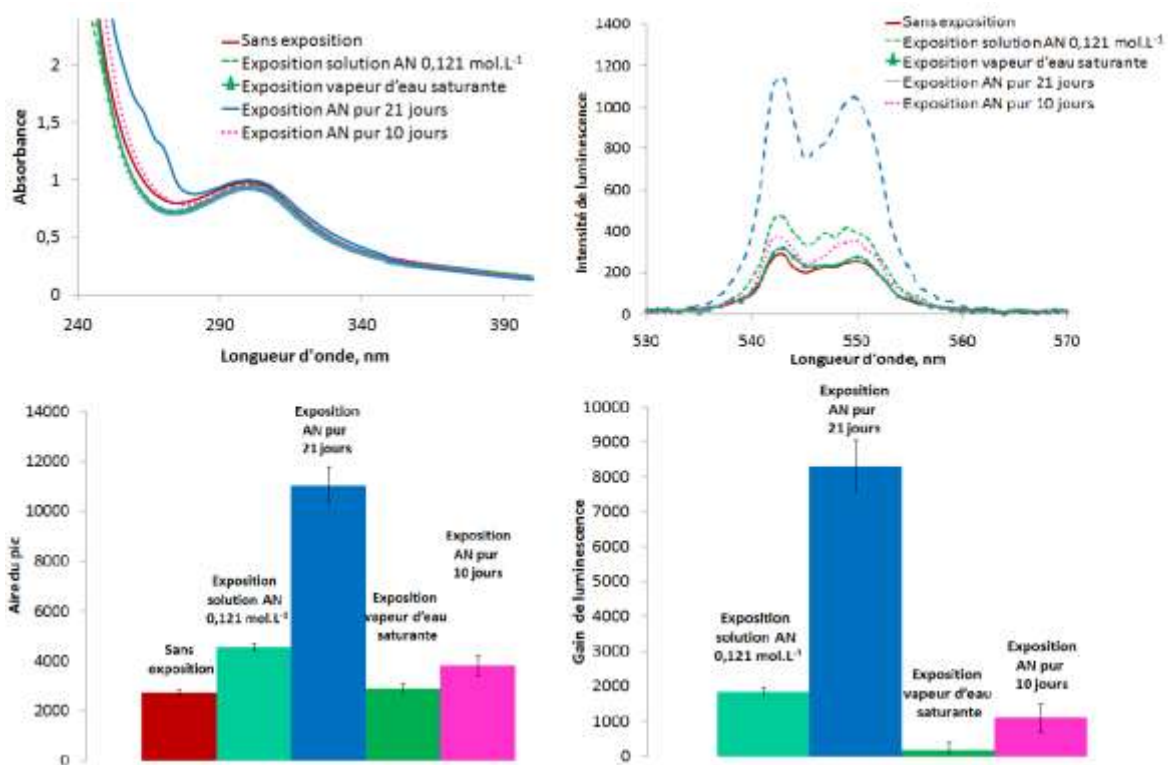


Figure 116. Haut : Spectres d'absorption (gauche) et de luminescence (droite) des matrices dopées de $Tb(NO_3)_3$ $6,24 mmol.L^{-1}$ et d'hexamine $0,87 mol.L^{-1}$ avant et après exposition à température ambiante aux vapeurs d'une solution saturée d'acide nicotinique ($0,121 mol.L^{-1}$), aux vapeurs émises par 50 mg d'acide nicotinique pur pendant 10 jours et 3 semaines, à de la vapeur d'eau. Bas : Aire de luminescence (gauche) et Gain de luminescence induite par l'exposition (droite).

Le pic de luminescence de Tb(III) excité situé à 545 nm en solution est dédoublé dans les matrices, les maxima d'émission étant situés à 543 nm et 550 nm. Un phénomène similaire avait été observé par Lenaerts et al. pour le complexe $Tb(AN)_2(phen)(H_2O)_2$ emprisonné dans une matrice de silice [1] mais ces auteurs ne donnent aucune explication sur le dédoublement de la bande. Dans une autre étude, Zhang et al. [2] trouvent un dédoublement de bande de luminescence de Tb(III) excité dans les complexes contenant de l'acide 3,4-furandicarboxylique $TbH(FRA)_2.3H_2O$ pur (en poudre) ou

TbH(FRA)₂(Phe).4H₂O pur, qui disparaît lorsque ce complexe est piégé dans une matrice nanoporeuse. Leurs explications du dédoublement de pic dû à l'effet du champ des ligands ne nous semblent pas satisfaisantes, sachant que les lanthanides ne sont pas sensibles à cet effet. Ces mêmes auteurs ont attribué l'absence du dédoublement dans les matrices sol-gel à l'inhomogénéité des populations de complexes dans les pores de différentes tailles, ce qui élargirait les pics d'émission en ne faisant plus qu'un.

Nos observations diffèrent car les pics d'émission sont dédoublés dans les matrices nanoporeuses, comparativement à ceux trouvés en solution. Ces observations sont rationalisées de la manière suivante. Nous avons vu qu'en solution la durée de vie de complexes Tb(Hexamine)₃(NO₃)(H₂O) et Tb(Hexamine)₄(H₂O) ne change pas et demeure égal à 390±30 μs bien que l'intensité de luminescence ait augmenté en fonction de la concentration d'hexamine. L'hypothèse d'un remplacement des molécules d'eau de la sphère de coordination par des molécules d'hexamine a été proposée pour expliquer l'augmentation d'intensité de luminescence. Pour expliquer l'invariance de la durée de vie de Tb³⁺, l'existence d'une désactivation de Tb³⁺ excité par couplage vibronique avec les oscillateurs CN de l'hexamine avait été suggérée. Les oscillateurs CN de l'hexamine viennent remplacer les oscillateurs OH des molécules d'eau et induisent le même effet. Ce couplage vibronique pourrait être perturbé dans les pores de la matrice, notamment si les ligands sont « figés » du fait du confinement du complexe dans un volume réduit. L'existence de micropores et de mésopores dans les matrices pourrait induire l'apparition de deux populations : des complexes quasi figés dans des pores très petits et des complexes « libres » dans des pores plus grands. Ces deux populations présenteraient des pics luminescence légèrement décalés de 234 cm⁻¹. Nous verrons par la suite que d'autres résultats viendront appuyer ces hypothèses, notamment avec les mesures de durées de vie des complexes dans les matrices monolithiques.

Les matrices non exposées possèdent une luminescence intrinsèque due à l'excitation directe de Tb³⁺ à 260 nm. L'aire de luminescence correspondante est donnée par le plot rouge de la figure 116 bas gauche. Après collecte de la luminescence des matrices exposées à la vapeur d'eau ou aux vapeurs d'acide nicotinique, le gain ou la perte de luminescence (figure 116, bas, droite) est obtenu par différence entre les deux aires de luminescence après et avant exposition. Il est à noter que la luminescence de Tb³⁺ ne diminue pas même après une exposition de 12H à de la vapeur d'eau à pression de vapeur saturante. Par ailleurs, l'exposition d'une matrice à une solution saturée d'acide nicotinique entraîne une augmentation de la luminescence du même ordre de grandeur que lors de l'exposition à de l'acide nicotinique pur pendant 10 jours. L'exposition à de la vapeur d'eau n'ayant eu que peu d'incidence sur l'augmentation de luminescence de Tb³⁺, on peut supposer que l'augmentation observée est due au remplacement des molécules d'eau par l'acide nicotinique. Ce dernier serait présent dans les complexes Tb(Hexamine)₃(NO₃)(AN) et Tb(Hexamine)₄(AN) et agirait comme une antenne en collectant les photons d'excitation pour les transférer à Tb(III). Il n'a cependant pas été possible d'estimer la concentration d'acide nicotinique piégé.

IV.1.2 Mesures des durées de vie de luminescence

Nous avons également entrepris des mesures de durées de vie de luminescence de Tb³⁺ dans ces matrices. Elles ont été exposées en mode statique avec le même dispositif décrit dans le chapitre III sous diverses conditions, puis irradiées à 266 nm avec une source Laser. Pour l'excitation laser, un porte échantillon est utilisé pour la matrice solide et des cales la maintiennent collée contre une des parois du porte-échantillon. La luminescence est collectée perpendiculairement à l'excitation. Les

détails du dispositif sont décrits dans l'annexe du chapitre IV. Les déclin de luminescence ont été mesurés pour les échantillons suivants :

- Matrice séchée avec une exposition à un flux d'Ar pendant 24H
- Matrice « sèche » conservée dans un dessiccateur
- Matrice exposée à de la vapeur d'eau saturante
- Matrice exposée à de la vapeur d'acide nicotinique pur
- Matrice exposée à de la vapeur d'acide nicotinique pur, puis à la vapeur d'eau saturante
- Matrice exposée à de la vapeur de nicotinate de méthyle
- Matrice exposée à de la vapeur d'acide nicotinique pur et à la vapeur de nicotinate de méthyle

Les figures ci-dessous regroupent les spectres d'absorption des échantillons et les cinétiques de déclin de luminescence de Tb^{3+} dans les diverses conditions décrites. Les durées de vie de luminescence déduites des déclin mono- ou bi-exponentiels sont collectées dans le tableau 39.

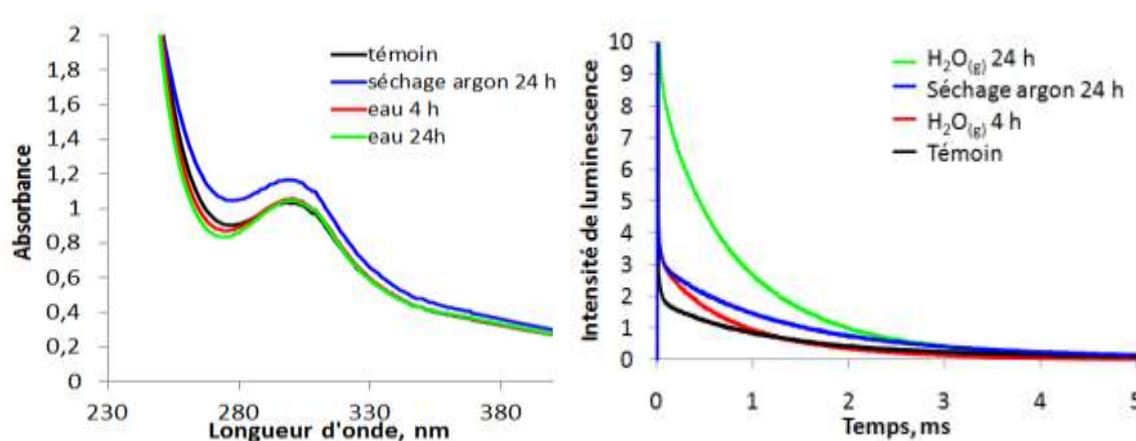


Figure 117. Gauche : spectres d'absorption de matrices dopées de Tb^{3+} ($6,24 \text{ mmol.L}^{-1}$) et d'hexamine ($0,87 \text{ mol.L}^{-1}$) après séchage par exposition à de l'argon sec puis exposition à de la vapeur d'eau saturante. Droite : déclin de luminescence mesurés pour les matrices après exposition.

Avec les matrices dopées de Tb^{3+} et d'hexamine séchées par exposition à un flux d'Ar pendant 24H ou sous dessiccateur, on trouve deux espèces luminescentes avec des durées de vie longues de $0,78 \pm 0,1$ et $2,1 \pm 0,2$ ms. L'ajout de la vapeur d'eau réduit encore plus les durées de vie de ces deux populations, qui deviennent égales à $0,40 \pm 0,03$ et $1,25 \pm 0,05$ ms. Ces observations corroborent les résultats précédents où l'existence de deux populations d'espèces luminescentes a été mise en évidence avec l'observation de pics de luminescence dédoublés. En particulier, nous pouvons envisager l'hypothèse d'une ligandation de $Tb(III)$ avec les groupements SiOH ou aminopropyle, comme représenté dans la figure 118. En effet, lorsque les matrices ont été séchées et que toute l'eau interstitielle a été enlevée, une interaction forte entre les groupements SiOH et aminopropyle présents en grande concentration dans les pores et le complexe pourrait exister. Les durées de vie très longues de $0,78 \pm 0,1$ et $2,1 \pm 0,2$ ms observées dans ce cas pourraient être attribuées à ces complexes. La plus longue correspondrait à celle de complexes immobilisés dans des pores de petite taille et celle correspondante à $0,78$ ms à un complexe plus « libre » occupant un espace plus grand dans un pore de plus grande taille.

Lorsque les matrices sont exposées à de la vapeur d'eau, les molécules d'eau viennent solvater le complexe, puis protoner progressivement le groupement amine de l'APTES et déprotoner

les groupements SiOH lorsque la quantité d'eau est suffisamment élevée. Les variations d'intensité de luminescence (entre 2 et 9) observées pour les matrices sèches et remplies d'eau (Figure 117), ne sont pas significatives compte-tenu du fait qu'il est difficile de positionner de manière identique les matrices dans le porte-échantillon. En revanche, les variations des déclin de luminescence sont significatives et montrent que le complexe de Tb(III) comporte de nouveau dans sa sphère de coordination une molécule d'eau. La durée de vie d'une des deux populations présentes dans la matrice, $0,42 \pm 0,03$ ms est très proche de celles observées dans les solutions aqueuses tamponnées à l'hexamine ($0,39 \pm 0,03$ ms). Nous attribuons ce premier temps de vie aux espèces « libres » $Tb(Hexamine)_3(NO_3)(H_2O)$ et $Tb(Hexamine)_4(H_2O)$ présentes dans des pores de grande taille et la durée de vie plus longue de $1,2 \pm 0,1$ à ces mêmes espèces figées dans des pores de petite taille.

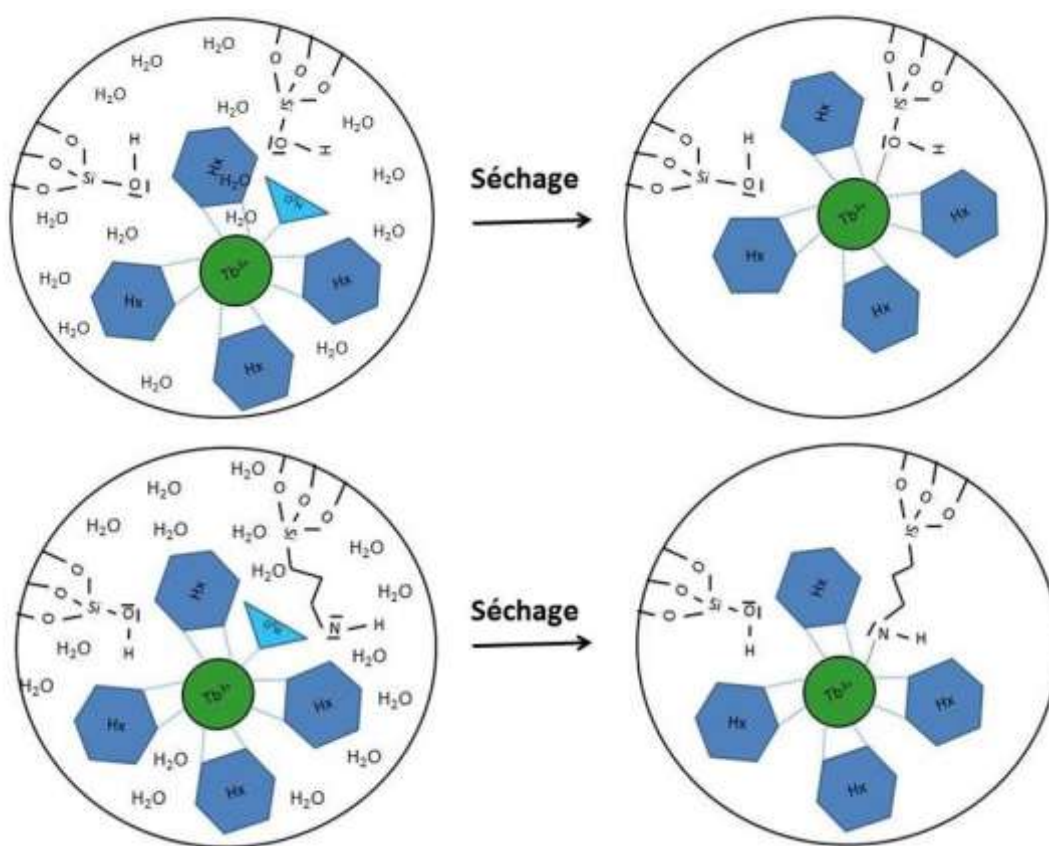


Figure 118. Représentation schématique des complexes de Tb(III) présents dans les pores des matrices nanoporeuses de TMOS/APTES 97/3 dopées de $Tb(NO_3)_3$ et d'hexamine

Tableau 39. Durées de vie de luminescence des divers complexes de Tb³⁺ présents dans les matrices dans différentes conditions d'exposition

Conditions d'exposition	Exponentielle 1			Exponentielle 2			R ²
	A ₁	A ₁ %	t ₁	A ₂	A ₁ %	t ₂	
Matrice séchée à l'argon 24 h	1,2	38	0,68	2,0	62	1,9	0,9991
Matrice séché sous dessiccateur	1,8	58	0,87	1,3	42	2,3	0,9968
Exposition à H ₂ O pendant 4 h	1,5	45	0,42	1,8	55	1,3	0,9992
Exposition à H ₂ O pendant 20 h	3,7	40	0,39	5,5	60	1,2	0,9996
Exposition à AN pendant 10 jours	11,6	46	0,44	13,5	54	1,4	0,9995
Exposition à AN pendant 3 semaines	41	38	0,33	67	62	1,2	0,9998
Exposition à AN pendant 10 jours puis à l'eau pendant 60 min.	6,7	44	0,35	8,5	56	1,3	0,9993
Exposition à l'eau pendant 30 min puis AN pendant 14 jours	7,0	38	0,34	11,6	62	1,2	0,9996
Exposition à MN pendant 14 h	0,5	56	0,39	0,4	44	1,2	0,9906
Exposition à MN pendant 7 jours	1,1	35	0,38	2,0	65	1,1	0,9988
Exposition à AN pendant 3 semaines puis à MN pendant 2 h	2,8	42	0,40	3,9	58	1,2	0,9997

De la même façon qu'en phase liquide, l'exposition d'une matrice à de l'acide nicotinique pendant 10 ou 21 jours entraîne une augmentation significative de l'intensité de luminescence. Les molécules d'acide nicotinique présentes dans la phase gazeuse sont bien piégées dans la matrice et viennent remplacer la molécule d'eau de coordination des complexes Tb(Hexamine)₃(NO₃)(H₂O) ou/et Tb(Hexamine)₄(H₂O) en formant des nouveaux complexes plus luminescents. L'intensité de luminescence augmente de 1,4 à 33 après 10 jours d'exposition et à 110 après 21 jours d'exposition. La durée de vie de ces complexes n'est pratiquement pas ou peu perturbée puisque l'on retrouve une valeur moyenne de 0,39±0,06 ms et 1,2±0,1 ms pour les deux populations observées.

Dans les deux expériences suivantes où une matrice préalablement exposée à de l'acide nicotinique pendant 10 jours a été exposée pendant 30 et 60 minutes à de la vapeur d'eau ou inversement exposée à de la vapeur d'eau pendant 30 minutes puis à l'acide nicotinique pendant 14 jours, on peut observer nettement l'effet de l'eau. Une diminution de la luminescence peut être observée : l'intensité diminue de 33 à 22 après 30 minutes d'exposition et de 22 à 2,4 après 30 minutes d'exposition supplémentaires. On retrouve les intensités de luminescence des matrices gorgées d'eau et les mêmes durées de vie de luminescence des deux populations de complexes. L'acide nicotinique qui a pu être piégé se trouve en très faible quantité devant celle de l'eau et peut aussi se trouver dans des pores ne contenant pas de complexe de Tb(III).

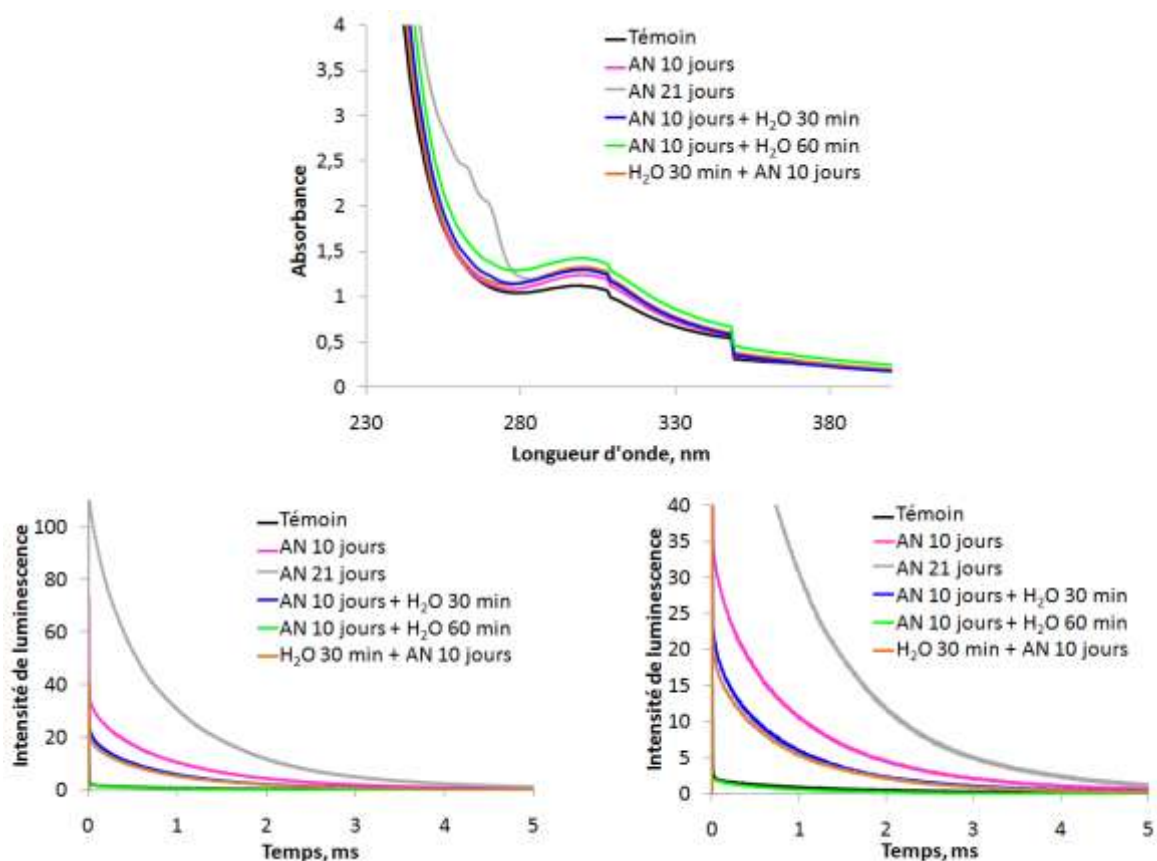


Figure 119. Haut : spectres d'absorption de matrices dopées de Tb³⁺ (6,24 mmol.L⁻¹) et d'hexamine (0,87 mol.L⁻¹) après exposition à des vapeurs d'acide nicotinique pur et/ou de la vapeur d'eau saturante. Bas : déclin de luminescence mesurés pour les matrices après exposition. La figure de droite correspond à une échelle moins étendue en ordonnée.

L'exposition d'une matrice dopée de Tb(III) et d'hexamine à des vapeurs de nicotinate de méthyle n'induit pas d'effet significatif, ni sur l'intensité de luminescence ni sur les durées de vie des deux populations présentes dans les matrices. En revanche lorsque la matrice est exposée pendant 3 semaines à des vapeurs d'acide nicotinique pur, puis à de la vapeur de nicotinate de méthyle pendant 2 h, on observe une diminution de l'intensité de luminescence de Tb(III) 110 à 6,5, sans que la durée de vie du complexe ne change. Ce résultat corrobore ceux de la phase liquide et montre l'interférence destructive du nicotinate de méthyle sur la luminescence de Tb(III). La tension de vapeur saturante du nicotinate de méthyle étant beaucoup plus élevée que celle de l'acide nicotinique, avec une exposition de 2H, la quantité de nicotinate de méthyle piégée dans la matrice est loin d'être négligeable. La Figure 120 montre l'absorption du nicotinate de méthyle piégé dans la matrice.

Avec les expositions statiques des matrices monolithiques, la quantité d'eau piégeable dans le volume poreux est très importante, comme nous l'avons vu dans le chapitre III. En revanche, en mode dynamique, nous avons également vu que ce rendement de piégeage est plus lent. Ces effets sont explorés dans la section suivante avec l'exposition de films minces dopés de Tb(NO₃)₃ et d'hexamine.

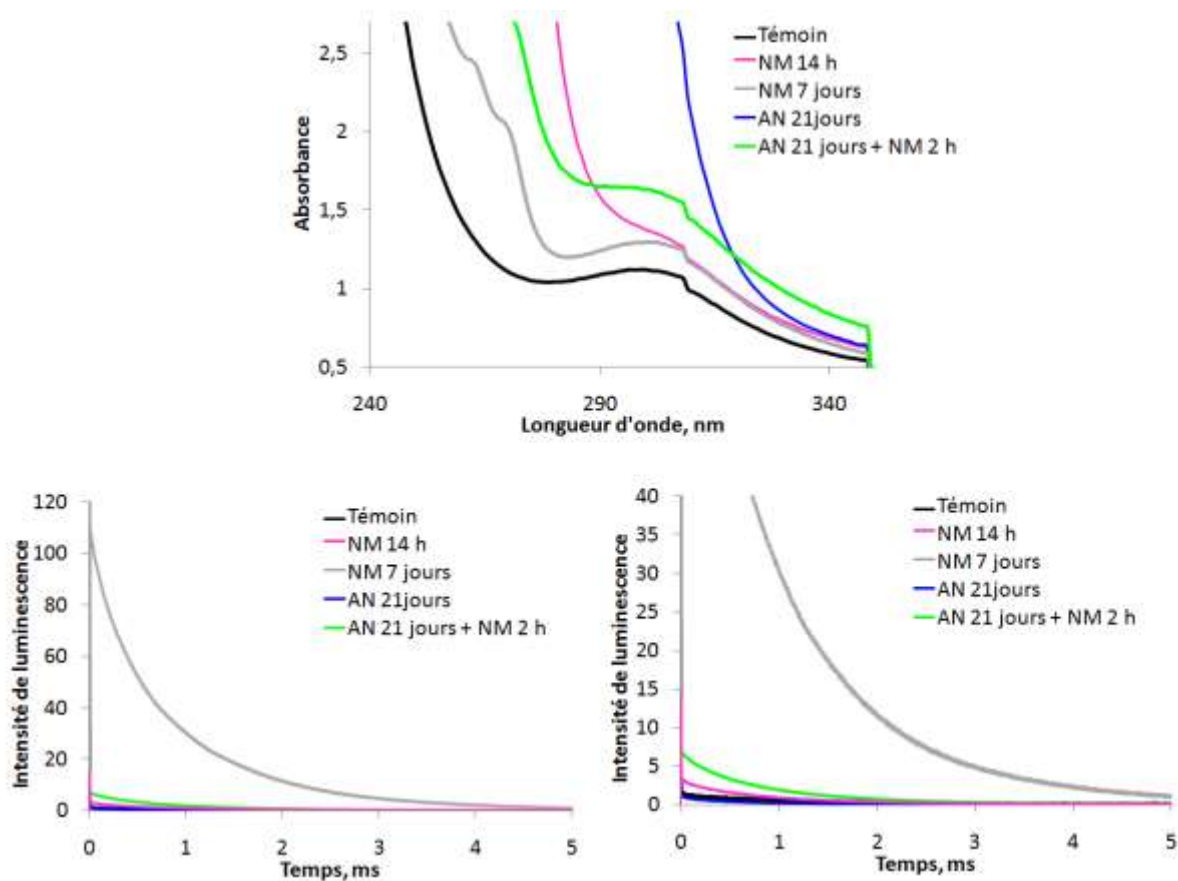


Figure 120. Haut : spectres d'absorption de matrices dopées de Tb^{3+} ($6,24 \text{ mmol.L}^{-1}$) et d'hexamine ($0,87 \text{ mol.L}^{-1}$) après exposition à des vapeurs de nicotinate de méthyle, en présence ou non d'acide nicotinique. Bas : déclin de luminescence mesurés pour les matrices après exposition. La figure en bas à droite correspond à une échelle moins étendue en ordonnée.

IV.2 Exposition dynamique de films minces à de la vapeur d'eau et à des mélanges gazeux humides calibrés d'acide nicotinique

Pour décorrélérer l'effet de l'humidité de celui de l'acide nicotinique, des couches minces ont été exposées séparément à de la vapeur d'eau et aux vapeurs humides d'acide nicotinique générées par extraction gaz liquide dans le dispositif précité. Dans le 1^{er} cas, pour reproduire les mêmes conditions, de l'eau pure est pompée dans la colonne. Dans les deux cas, la température de chauffage de la colonne est de 70°C et le débit de gaz vecteur de 400 mL.min^{-1} . La durée d'exposition est de 60 minutes. Des matrices vierges et des matrices dopées de Tb^{3+} à 25 mmol.L^{-1} ont été utilisées.

Les trois matrices sont fortement dopées de $Tb(\text{NO}_3)_3$ et la luminescence observée provient de l'excitation directe de Tb^{3+} . Avant leur exposition à la vapeur d'eau, les 3 matrices ont une intensité de luminescence similaire, approchant la valeur de 3500. Après exposition des matrices à de la vapeur d'eau issue du système de génération, une augmentation de la luminescence de Tb^{3+} peut être observée. L'intensité est à peu près multipliée par deux.

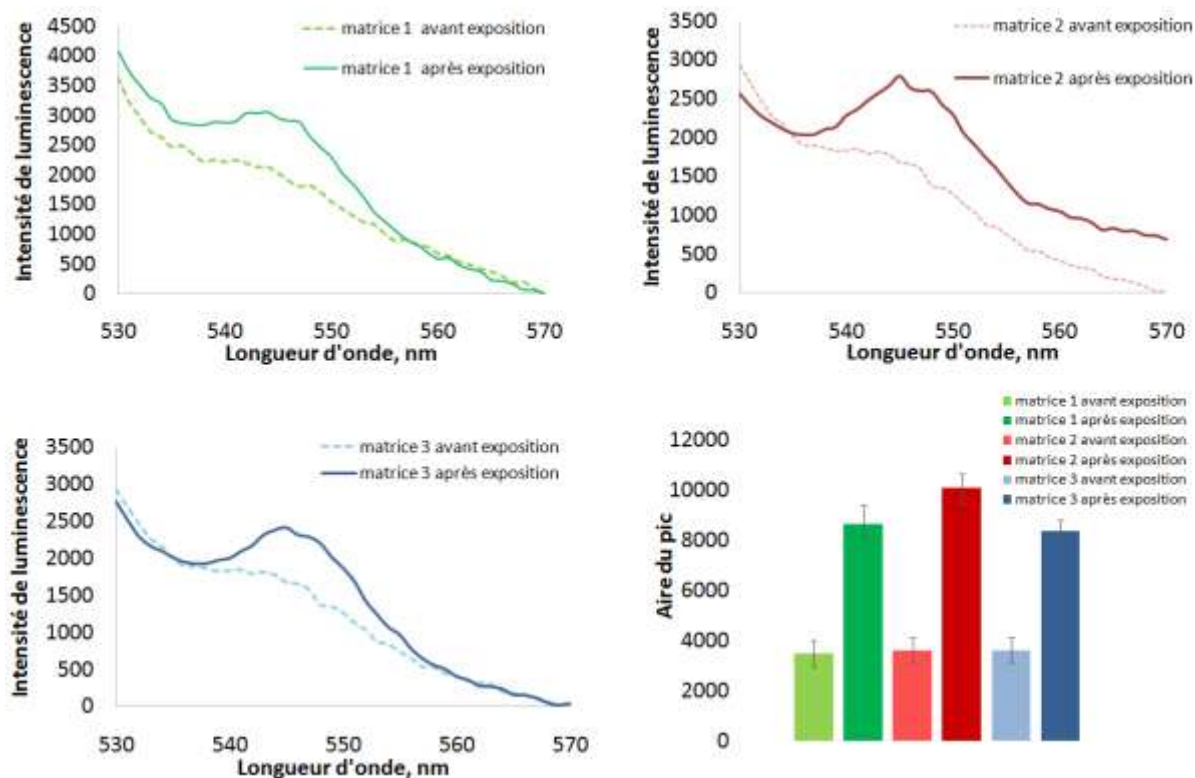


Figure 121. Luminescence de couches minces dopées de Tb^{3+} 25 $mmol.L^{-1}$ avant et après exposition à de la vapeur d'eau saturante. Durée d'exposition : 60 minutes, débit gaz : $400 mL.min^{-1}$, température de chauffage de la colonne : $70^{\circ}C$.

Cette augmentation de luminescence pourrait être reliée à la variation du pH intrapore dans la matrice. En absence d'eau ou en présence d'eau interstitielle piégée dans les pores, les espèces chargées sont sous forme de paires d'ions et la matrice présente une basicité due à la présence de l'hexamine et des chaînes aminopropyle intrinsèque à la matrice. En présence de vapeur d'eau saturante, les pores du matériau sont très rapidement remplis d'eau et les équilibres acido-basiques sont établis. Le sol étant tamponné au départ pour un pH autour de 6,4, on doit retrouver à peu près ce pH dans la matrice remplie d'eau. L'intensité de luminescence obtenue est en bon accord avec celle que nous avons trouvée lorsque la concentration de Tb^{3+} est autour de $6 mmol.L^{-1}$, mais avec une concentration d'hexamine un peu plus faible de $0,14 mol.L^{-1}$ (comparer avec la figure 27 du chapitre II). Ces résultats sont à comparer aux résultats d'exposition de matrices dopées à des vapeurs d'acide nicotinique saturées d'eau.

Les résultats des expositions de films minces dopées de Tb^{3+} à des vapeurs d'acide nicotinique sont présentés dans la figure 122. Les trois matrices 4, 5 et 6 avant exposition ont une luminescence similaire avec une intensité approchant la valeur de 3000. Après exposition des matrices à un flux gazeux d'acide nicotinique saturé d'eau, une augmentation de la luminescence peut être observée. Son intensité après exposition est multipliée par un facteur allant de 7,5 à 8,75 pour les matrices 4 et 5. La matrice 6 présente une augmentation équivalente à celle obtenue pour des matrices exposées au mélange gazeux contenant uniquement la vapeur d'eau. Cette augmentation est comparée à celle obtenue lors de l'exposition de matrices à de la vapeur d'eau dans la figure 121. Les données obtenues de la matrice 6 n'ont pas été utilisées pour la comparaison.

Le signal moyen de luminescence après exposition de matrices à un flux d'acide nicotinique saturé d'eau est 2,5 supérieur au signal résultant de l'exposition de matrices à de la vapeur d'eau.

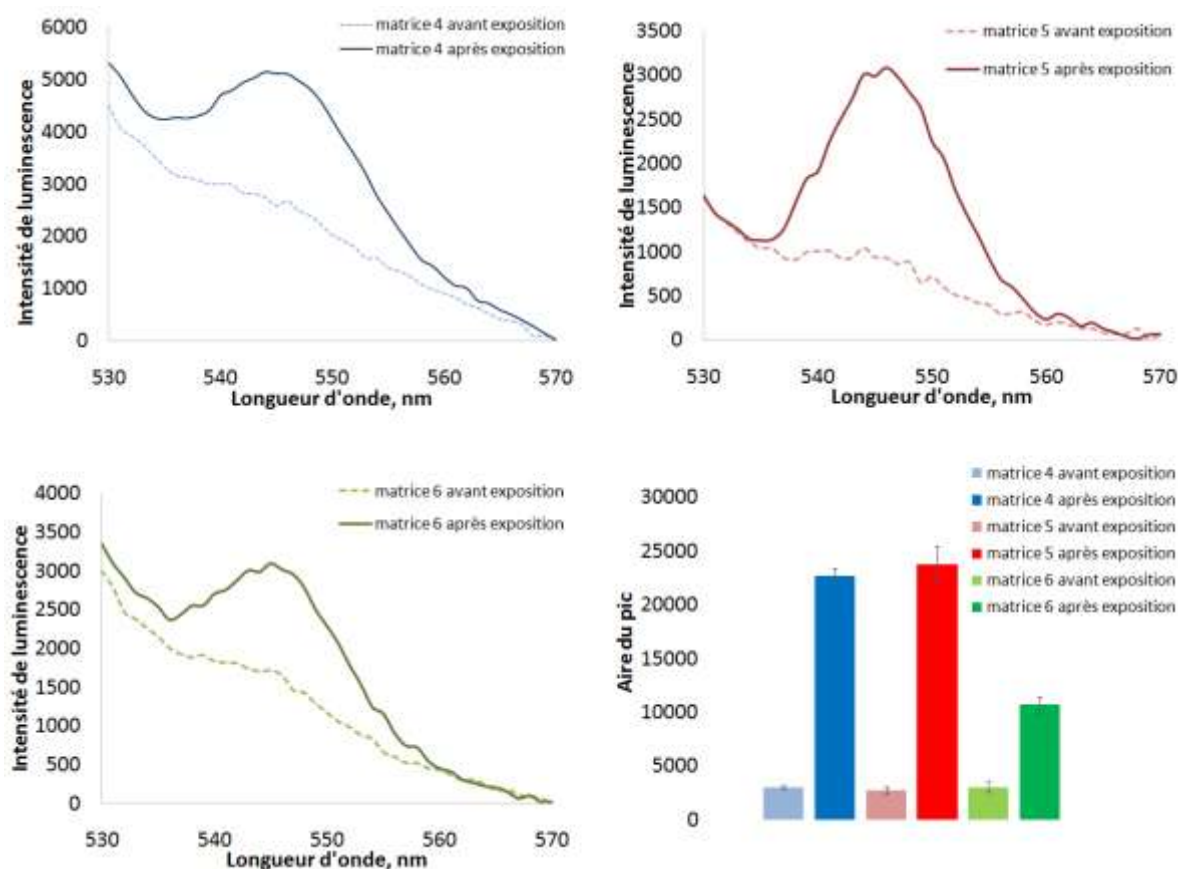


Figure 122. Luminescence de couches minces dopées de Tb^{3+} avant et après exposition à des vapeurs d'acide nicotinique. Tb^{3+} dans le sol : 4 mmol.L^{-1} , durée d'exposition : 60 minutes, débit : 400 mL.min^{-1} , température de chauffage : 70°C , concentration AN estimée : 205 ppb.

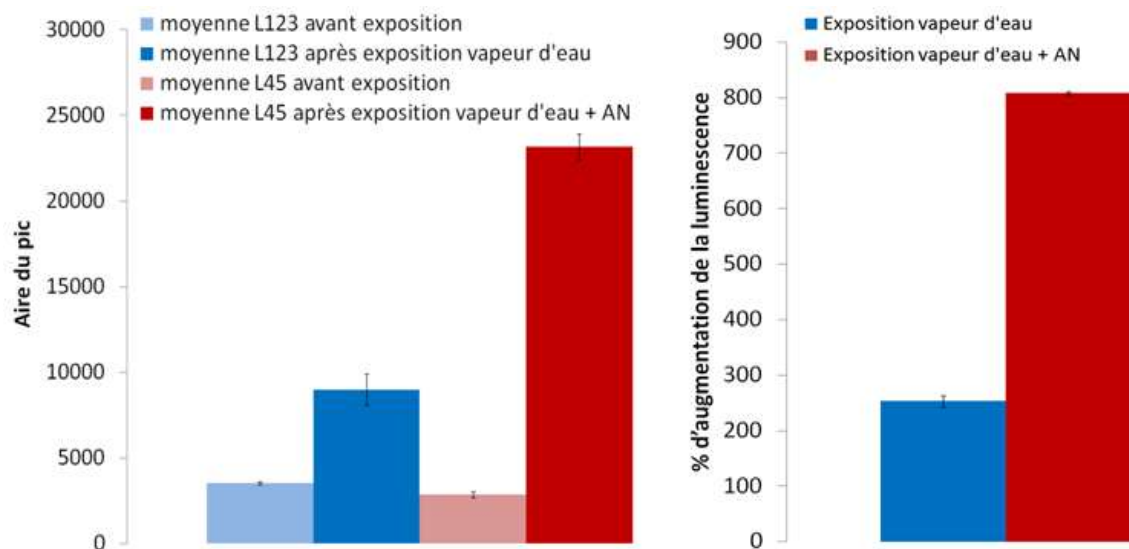


Figure 123. Gauche : Luminescence moyenne des films minces dopés de $Tb(NO_3)_3$ 25 mmol.L^{-1} et d'hexamine $3,5 \text{ mol.L}^{-1}$ avant et après exposition à de la vapeur d'eau (bleu) et aux vapeurs d'acide nicotinique et d'eau (rouge) et droite : pourcentage d'augmentation de la luminescence $(I_{\text{eau}} - I_{\text{sec}}) / I_{\text{sec}}$ ou $(I_{(\text{eau}+\text{NA})} - I_{\text{sec}}) / I_{\text{sec}}$.

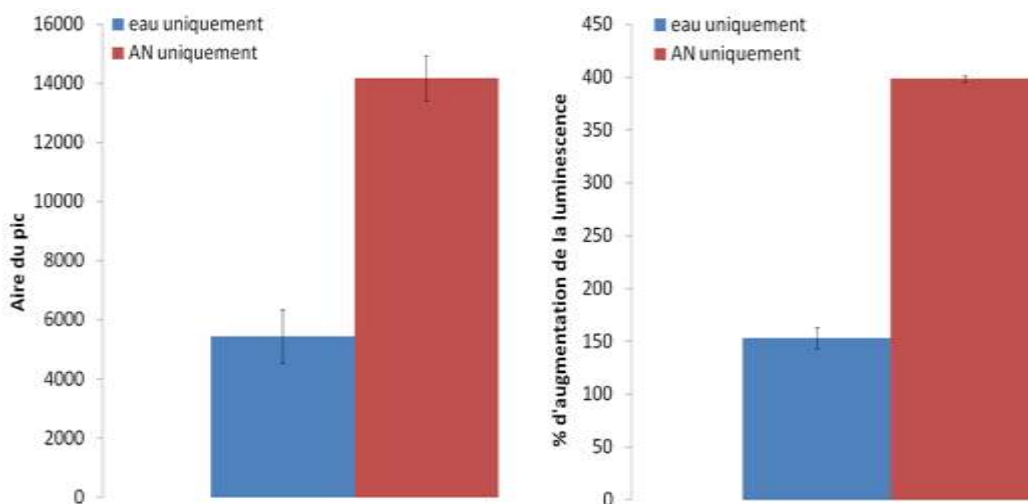


Figure 124. Contribution individuelle de l'eau et de l'acide nicotinique à la luminescence de la matrice après exposition à un flux d'acide nicotinique. Gauche : contribution nette de l'eau et de l'acide nicotinique à la luminescence, droite : accroissement de la luminescence.

Le pourcentage d'augmentation de la luminescence suite à l'exposition au mélange acide nicotinique-vapeur d'eau est de 800 % contre 250 % pour l'exposition à de la vapeur d'eau seule. Ces données permettent également de calculer la contribution de l'acide nicotinique seul, en soustrayant la contribution de la vapeur d'eau, en supposant que les deux contributions peuvent être considérées de manière indépendante.

La présence d'acide nicotinique dans le flux est responsable d'une augmentation de 14000 unités de la luminescence de la matrice. La vapeur d'eau induit une augmentation du signal de luminescence de 6000 unités. L'augmentation de la luminescence induite par l'exposition à la vapeur d'eau seule est de 153 %, la présence d'acide nicotinique dans le flux gazeux est responsable d'un accroissement de 398 % de la luminescence de la matrice. Ces résultats montrent que dans les conditions d'exposition utilisées, l'acide nicotinique gazeux est le contributeur majoritaire à la luminescence de Tb(III) excité par effet d'antenne.

V. Comparaison avec les données de la littérature

On trouve de nombreux travaux sur la luminescence de complexes de lanthanides à l'état solide cristallin et la comparaison de leurs propriétés avec celles obtenues en solution [3] [4]. Un grand nombre d'études a été mené en vue d'incorporer des complexes de lanthanides dans des matrices solides [5]. Dans la plupart des cas, il s'agit d'encapsuler des complexes hybrides de lanthanide déjà synthétisés dans des matériaux poreux pour étudier l'effet du confinement sur les propriétés luminescentes des complexes [1] [6] [7]. Quelques études font état de l'évolution in situ de l'espèce luminescente lors de la synthèse du matériau, de la préparation du sol jusqu'à la gélification [6]. Les matériaux poreux sont majoritairement des couches minces et des xérogels préparés à partir de la méthode sol-gel [8] [9] et l'Eu et le Tb sont les lanthanides les plus utilisés [1] [10] [9] [11]. Les travaux menés sur les applications des matériaux luminescents « sol gel » formés à partir des matrices de silice dopées de complexes de lanthanides concernent principalement des utilisations en tant que dispositifs optiques pour la production de sources laser [12], de diodes électroluminescentes ou de systèmes de conversion de rayonnements [13]. Les applications de type « capteur chimique » sont souvent restreintes à l'utilisation de couches minces dopées destinées à la

détection d'espèces en solution aqueuse [14] [15] [16]. A notre connaissance, aucune étude n'a été menée concernant l'exposition de monolithes ou de films minces dopés de cations lanthanides produits par la méthode sol-gel pour la détection de composés organiques volatils. Nous comparerons donc nos résultats avec les quelques travaux portant sur les propriétés optiques des complexes de Tb(III) confinés des pores de matériaux « sol-gel ».

Un premier résultat remarquable est le dédoublement des pics de luminescence de Tb(III) quand on passe de la solution à la phase solide avec les matrices nanoporeuses. Deux maxima sont observés à 543 et 550 nm, comparativement à 547 nm pour les solutions aqueuses. Ce dédoublement est accompagné de déclin biexponentiels de luminescence des complexes Tb-hexamine témoignant de l'existence de deux populations de complexes au sein des monolithes : des complexes localisés dans des pores de faibles dimensions et des complexes localisés dans des pores de grandes dimensions. Les complexes situés dans les petits pores ont un mouvement restreint, ce qui limite les désactivations non radiatives et rallonge le temps de vie de luminescence. A l'inverse les complexes situés dans des pores plus grands ont un mouvement plus libre, ce qui favorise les désactivations non radiatives et raccourcit leur durée de vie. En l'absence de molécules d'eau dans les pores des matrices bien séchées, les désactivations non radiatives diminuent plus encore et les deux durées de vie de luminescence augmentent d'un facteur 2.

D'autres travaux de la littérature font état de dédoublement de bandes d'émission de luminescence mais le phénomène n'est pas toujours expliqué. Des dédoublements de bandes sont observés dans les travaux de Lenaerts et al. [1] lors de l'étude de la luminescence de monolithes hybrides TMOS/diéthoxydiméthylsilane dopés du complexe Tb(AN)₃(phen)(H₂O)₂ où les ligands AN (acide nicotinique) sont mono (1) et bidentates (2) et phen (5-(N,N-bis-3-(triéthoxysilyl)-propyl)ureyl-1,10-phénanthroline) sont bidentates. Fort curieusement, ces auteurs ne font état que d'une seule durée de vie de luminescence de 1,5 ms. Par ailleurs, Sokolnicki et al. [17] ont également observé des déformations des bandes de luminescence de Tb(III)* dans des monolithes de silice dopés de complexes Eu(porphyrins)Cl₃ ou Tb(porphyrins)Cl₃ en comparant les spectres de luminescence des matrices à ceux des complexes en solution. Les auteurs ont supposé que ces déformations sont dues à des interactions des complexes avec la matrice de silice ou à des déformations des complexes au sein de la matrice.

Dans certaines matrices sol gel des mesures de luminescence de lanthanides montrent des déclin de luminescence monoexponentiels. Yan et al. [10] et Fu et al. [5] ont observé des déclin monoexponentiels respectivement pour des complexes de Tb-acide furandicarboxylique-phénanthroline (Tb(FRA)₂(phen)(H₂O)) et de Tb-acide o-hydroxy benzoïque (Tb(o-HBA)₃(H₂O)₃) sous forme de solides cristallins purs et incorporés dans des matrices de TEOS réduites en poudre. Les temps de vie mesurés pour ces complexes purs et confinés dans les matrices sont très proches, de 0,78 ms et 0,96 ms [10] et de 1,8 et 2 ms [5]. Il est à noter que la synthèse du matériau « sol-gel » luminescent a été effectuée par dopage one pot dans l'étude de Fu et al. à partir de chlorure de Tb en présence des ligands organiques [5]. Lenaerts et al. [1] ont mesuré une durée de vie de luminescence de 1,5 ms pour un complexe Tb-acide nicotinique-phénanthroline également incorporé dans des monolithes préparés par procédé sol gel. Il est à noter que la phénanthroline utilisée comme co-ligand a été modifiée pour être liée par liaison covalente à la matrice de silice, de sorte que le complexe soit réparti de manière plus homogène dans la matrice.

En revanche, d'autres travaux mentionnent l'existence de deux populations de complexes luminescents. Meng et al. [18] ont mesuré la luminescence de complexes Eu(III)-

dibenzoylmethanide-phenanthroline ($\text{Eu}(\text{DBM})_3(\text{phen})$) incorporés dans une matrice de silice à base de TEOS et déposée sur des substrats de quartz. Les déclin de luminescence observés étaient biexponentiels, avec des temps de vie de 0,73 et 2,56 ms. Les auteurs ont expliqué la présence de ces deux temps de vie par les inhomogénéités de la matrice. Cette explication est similaire à celle que nous avons évoquée pour expliquer les spectres de luminescence des matrices et la présence des deux durées de vie de luminescence. Néanmoins aucun dédoublement de pic n'a été observé par ces auteurs, ce qui n'est pas surprenant, les auteurs ayant travaillé avec des fentes de 0,8 mm en excitation et en émission. Huang et al. [19] ont également observé des déclin de luminescence biexponentiels lors de la mesure de la luminescence de poudres de matrices de TEOS dopées d'un complexe d'euporium-acide-2,2-(((2,4,6-Triméthyl-1,3-phenylene)-bis-(méthylène))-bis-(oxy))-dibenzoïque (H_2L)-phénanthroline ($\text{Eu}_2(\text{L})_2(\text{phen})_2$). Les temps de vie mesurés étaient de l'ordre de 0,6 et 1,3 ms.

Nous pouvons remarquer une très grande disparité des durées de vie de l'état luminescent de Tb(III) dans la littérature. Il est très difficile de comprendre ou de prédire les durées de vie lorsqu'on sait que celles-ci peuvent dépendre à la fois de la nature des ligands (niveau d'énergie de l'état triplet excité, interaction vibronique avec Tb^*), de la porosité de la matrice (taille des pores, groupements fonctionnels à la surface des pores) et de son degré d'humidité. Hors, les travaux ne rapportent pas toujours ces paramètres. Ainsi, de manière surprenante, la durée de vie de luminescence du complexe $\text{Tb}(\text{o-HBA})_3(\text{H}_2\text{O})_3$ [5] cristallin ou incorporé dans une matrice sol gel, qui contient 3 molécules d'eau dans la 1^{ère} sphère de coordination (1,8 et 2,0 ms) est plus importante que celles des complexes $\text{Tb}(\text{FRA})_2(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})$ pur et confiné (0,78 et 0,96 ms) [10], ou encore de $\text{Tb}(\text{AN})_3(\text{phen})_2(\text{H}_2\text{O})_2$ confiné (1,5 ms) [4] qui contiennent moins de molécules d'eau. Or Arnaud et al. [20] ont montré que la durée de vie de luminescence de Tb^{3+} pouvait varier de 3,3 à 1,85 à 1,28 et 0,98 ms selon le nombre de molécules d'eau de 0 à 1 à 2 et à 3 dans la 1^{ère} sphère de coordination. Dans les quelques d'études où les auteurs ont pu suivre l'évolution in situ de l'espèce luminescente lors de la synthèse du matériau, de la préparation du sol jusqu'à la gélification [6], on observe une augmentation de la durée de vie de luminescence lorsqu'on passe du sol (~480 μs) au xérogel final (2 ms). Dans notre cas, nous avons bien vu que la durée de vie de $\text{Tb}(\text{hexamine})_4(\text{AN})$ pouvait varier de 1,2 à 2,3 ms lorsque la matrice est humide ou bien sèche.

VI. Conclusion

L'objectif visé dans ce chapitre est d'explorer la possibilité d'utiliser des matrices nanoporeuses dopées de $\text{Tb}(\text{NO}_3)_3$ et d'hexamine pour la détection de vapeurs d'acide nicotinique en présence d'interférents. A cet effet, un premier travail a consisté à générer de manière reproductible des mélanges gazeux calibrés d'acide nicotinique. Pour ce composé très peu volatil, les mélanges gazeux ont pu être obtenus dans une gamme de concentration de 60 à 200 ppb en utilisant un mode d'extraction gaz/liquide dans une colonne de strippage. Des matrices monolithiques et des films minces dopés respectivement de Tb(III) 6,25 et de 25 mmol.L^{-1} ont été produits et exposés en mode statique ou/et dynamique à des mélanges gazeux.

Les études de la variation de l'intensité de luminescence de Tb(III) et les mesures de durée de vie de luminescence en fonction de divers paramètres d'exposition ont permis de montrer qu'il existe deux populations d'espèces luminescentes et que leur durée de vie est plus longue dans les matrices solides qu'en solution. Ces deux populations correspondent aux mêmes complexes trouvés en solution, soit $\text{Tb}(\text{Hexamine})_3(\text{NO}_3)(\text{H}_2\text{O})$ et $\text{Tb}(\text{Hexamine})_4(\text{H}_2\text{O})$, mais leur durée de vie dépend

d'une part de la taille du pore dans lequel ils se trouvent et d'autre part du taux d'hydratation de la matrice. Ainsi lorsque ces complexes sont « figés » dans des petits pores (micropores) ou « libres » dans des pores de plus grande taille (mésopores) et interagissent avec les groupements fonctionnels de surface en absence de molécules d'eau interstitielles, leur durée de vie est très longue, respectivement de $0,78 \pm 0,1$ et de $2,1 \pm 0,2$ ms. L'hydratation de la matrice réduit ces temps de vie, respectivement à $0,39 \pm 0,06$ et $1,2 \pm 0,2$ ms. On retrouve en particulier dans les pores de grande taille qui peuvent contenir des centaines à quelques milliers de molécules d'eau une durée de vie de l'une des populations identique à celle de ces mêmes complexes en milieux aqueux.

Nous avons également montré qu'en présence de vapeurs d'acide nicotinique, celui-ci remplace avantageusement la molécule d'eau de la sphère de coordination de Tb(III) pour former les complexes $\text{Tb}(\text{Hexamine})_3(\text{NO}_3)(\text{AN})$ et $\text{Tb}(\text{Hexamine})_4(\text{AN})$ dont la luminescence est fortement exaltée par effet d'antenne sans que leur durée de vie ne change. Cependant, comme en solution, les interférences d'un autre marqueur beaucoup plus volatil, le nicotinate de méthyle, sont destructives car ce dernier absorbe compétitivement et de manière plus efficace tous les photons d'excitation. Ainsi, la détection de l'acide nicotinique gazeux en présence de marqueurs volatils est compromise. D'autres stratégies pourraient être envisagées en tenant compte de la très faible volatilité de l'acide nicotinique. Il s'agirait de piéger en amont l'eau, le gaz carbonique et les autres composés volatils émis par un condensat d'haleine et de poursuivre dans une 2^{ème} étape en acidifiant et en chauffant le condensat restant pour évaporer l'acide nicotinique resté en solution et le piéger et détecter via la luminescence de Tb(III). Cette stratégie implique la synthèse de divers matériaux de piégeage pour les composés volatils potentiellement présents dans l'haleine. Par ailleurs, il faut pouvoir générer des vapeurs d'acide nicotinique à des teneurs sub-ppb, ce qui correspond à un autre défi.

Bibliographie

1. Lenaerts, P., C. Gorller-Walrand, and K. Binnemans, *Luminescent europium(III) and terbium(III) nicotinate complexes covalently linked to a 1,10-phenanthroline functionalised sol-gel glass*. Journal of Luminescence, 2006. **117**(2): p. 163-169.
2. Zhang, H.J., et al., *The photophysical properties of binary and ternary complexes of rare earths with conjugated carboxylic acids and 1,10-phenanthroline*. Journal of Photochemistry and Photobiology a-Chemistry, 1997. **109**(3): p. 223-228.
3. Ren, Y.Y., B.L. An, and Q.A. Xu, *Strong luminescence of novel water-soluble lanthanide complexes sensitized by pyridine-2,4,6-tricarboxylic acid*. Journal of Alloys and Compounds, 2010. **501**(1): p. 42-46.
4. Bunzli, J.C.G. and M.M. Vuckovic, *FT-IR and fluorometric investigation of rare-earth and metallic ion solvation. 4. Spectroscopic properties of anhydrous and aqueous solutions of terbium perchlorate and nitrate - Coordination number of the Tb(III) ion*. Inorganica Chimica Acta-Articles, 1983. **73**(1): p. 53-61.
5. Binnemans, K., *Lanthanide-Based Luminescent Hybrid Materials*. Chemical Reviews, 2009. **109**(9): p. 4283-4374.
6. Fu, L.S., et al., *In situ synthesis of terbium-benzoic acid complex in sol-gel derived silica by a two-step sol-gel method*. Journal of Physics and Chemistry of Solids, 2000. **61**(11): p. 1877-1881.
7. Yan, B., et al., *Luminescence properties of rare-earth (Eu³⁺ and Tb³⁺) complexes with paraaminobenzoic acid and 1,10-phenanthroline incorporated into a silica matrix by sol-gel method*. Materials Research Bulletin, 1998. **33**(10): p. 1517-1525.
8. Zhang, R.J., et al., *Fluorescence lifetime and energy transfer of rare earth beta-diketone complexes in organized molecular films*. Thin Solid Films, 2000. **363**(1-2): p. 275-278.
9. Feinle, A., et al., *Novel Sol-Gel Precursors for Thin Mesoporous Eu³⁺-Doped Silica Coatings as Efficient Luminescent Materials*. Chemistry of Materials, 2012. **24**(19): p. 3674-3683.
10. Yan, B., H.J. Zhang, and J.Z. Ni, *Luminescence properties of the rare earth (Eu³⁺ and Tb³⁺) complexes with 1,10-phenanthroline incorporated in silica matrix by a sol-gel method*. Materials Science and Engineering B-Solid State Materials for Advanced Technology, 1998. **52**(2-3): p. 123-128.
11. Li, Y.J. and B. Yan, *Lanthanide (Eu³⁺, Tb³⁺)/beta-Diketone Modified Mesoporous SBA-15/Organic Polymer Hybrids: Chemically Bonded Construction, Physical Characterization, and Photophysical Properties*. Inorganic Chemistry, 2009. **48**(17): p. 8276-8285.
12. Nakamura, K., et al., *Enhanced lasing properties of dissymmetric Eu(III) complex with bidentate phosphine ligands*. Journal of Physical Chemistry A, 2007. **111**(16): p. 3029-3037.
13. Sivakumar, S. and F. van Veggel, *Red, green, and blue light through cooperative up-conversion in sol-gel thin films made with Yb_{0.80}La_{0.15}Tb_{0.05}F₃ and Yb_{0.80}La_{0.15}Eu_{0.05}F₃ nanoparticles*. Journal of Display Technology, 2007. **3**(2): p. 176-183.
14. Barja, B.C., et al., *Luminescent Eu(III) hybrid sensors for in situ copper detection*. Sensors and Actuators B-Chemical, 2011. **158**(1): p. 214-222.
15. Blair, S., R. Katakya, and D. Parker, *Sol gel-immobilised terbium complexes for luminescent sensing of dissolved oxygen by analysis of emission decay*. New Journal of Chemistry, 2002. **26**(5): p. 530-535.
16. Blair, S., et al., *Narrow-range optical pH sensors based on luminescent europium and terbium complexes immobilized in a sol gel glass*. Inorganic Chemistry, 2001. **40**(23): p. 5860-5867.
17. Sokolnicki, J., et al., *Spectroscopic behavior of hybrid materials obtained by the sol-gel technique*. Optical Materials, 2004. **26**(2): p. 199-206.
18. Meng, Q.G., et al., *Preparation and optical characterization of an organoeuropium-doped sol-gel transparent luminescence thin film*. Thin Solid Films, 2001. **388**(1-2): p. 87-92.

19. Huang, X.G., et al., *Encapsulating a Ternary Europium Complex in a Silica/Polymer Hybrid Matrix for High Performance Luminescence Application*. Journal of Physical Chemistry C, 2011. **115**(5): p. 2332-2340.
20. Arnaud, N. and J. Georges, *Comprehensive study of the luminescent properties and lifetimes of Eu³⁺ and Tb³⁺ chelated with various ligands in aqueous solutions: influence of the synergic agent, the surfactant and the energy level of the ligand triplet*. Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2003. **59**(8): p. 1829-1840.

CONCLUSION GENERALE

La tuberculose est actuellement une des causes majeures de mortalité chez l'adulte dans le monde. Cette maladie tue environ 2 millions de personnes par an, souvent parce que la maladie n'a pas été diagnostiquée, ou trop tardivement pour être traitée. Les techniques de diagnostic sont longues à mettre en œuvre ou trop complexes et coûteuses pour être mises en œuvre dans les zones de forte occurrence de la maladie, souvent dans les pays en voie de développement. Pour répondre à ce besoin, l'un des objectifs du consortium COVADIS est d'explorer de nouvelles voies de diagnostic de la maladie et en particulier celle très prometteuse de la détection de métabolites spécifiques de *Mycobacterium Tuberculosis*.

C'est dans ce contexte que cette thèse se veut de rechercher des solutions innovantes. Le travail s'appuie sur la synthèse de bioMérieux, partenaire du projet, qui propose de focaliser l'étude sur la détection d'un métabolite très spécifique de *Mycobacterium Tuberculosis*, l'acide nicotinique (AN), et sur des métabolites secondaires potentiellement interférents tels que le nicotinate de méthyle, le para-anisate de méthyle, le phénylacétate de méthyle et l'ortho-phénylanisole. Le choix de ces métabolites repose sur les travaux de l'équipe de Syhre de l'Université d'Otago, avec lequel les chercheurs de bioMérieux collaborent. A ces métabolites, nous avons rajouté l'acide benzoïque qui nous semblait pertinent du fait de sa présence dans de nombreux milieux biologiques et dans l'alimentation. L'acide nicotinique est présent dans l'haleine des patients malades à des teneurs de quelques dizaines à quelques centaines de ppq (10^{-14}), ce qui correspondrait à une concentration de quelques dizaines à la centaine de pmol.L⁻¹ en phase liquide dans un condensat d'haleine provenant de 10 L de vapeur exhalée. Pour pouvoir détecter de si faibles niveaux d'acide nicotinique, la voie qui nous est apparue la plus appropriée est l'utilisation de sonde lumineuse à fort rendement de luminescence couplée à une méthode de pré-concentration de l'analyte. Le laboratoire Francis Perrin possède une expertise en matière de pré-concentration des analytes grâce à l'utilisation de matériaux nanoporeux agissant comme des éponges pour le piégeage de composés gazeux et comme des nanoréacteurs pour exalter des réactions chimiques en milieu confiné.

Le projet vise donc un capteur luminescent à base de matériaux nanoporeux. Un lanthanide, le terbium (III) dont la luminescence peut être fortement exaltée par un effet d'antenne selon la nature des ligands, a été choisi. Elaborer un capteur nanoporeux dopé d'un sel de terbium et l'exposer à des mélanges gazeux calibrés d'acide nicotinique, nécessite de nombreuses étapes préliminaires. Une première étape a consisté à trouver les conditions environnementales nécessaires à la formation de complexes Tb(III)/AN fortement luminescents et à explorer la nature des interférences potentielles des autres marqueurs. Ces études ont été tout d'abord réalisées en milieu aqueux et les paramètres qui ont été variés sont le pH du milieu, la présence de tampons et les concentrations des réactifs. Cette étude a permis de montrer que le milieu le plus favorable à la formation de complexes Tb(III)/AN est un milieu proche de la neutralité (pH = 6,4) tamponné à l'hexamine, dans lequel l'acide nicotinique se trouve sous la forme déprotonnée et anionique la plus favorable à la formation de complexes stables. Les complexes formés en solution selon les réactifs en présence, Tb(NO₃)₃(H₂O)₃, Tb(Hexamine)₄(NO₃), Tb(Hexamine)₄(H₂O), Tb(Hexamine)₄(AN) présentent tous la particularité remarquable d'avoir une même durée de vie en solution aqueuse, de 390±30 μs. La présence d'acide nicotinique induit par effet d'antenne une exaltation de la luminescence de

Tb(III) dont l'intensité varie linéairement avec la concentration d'acide nicotinique. Le dosage de l'acide nicotinique dans ce milieu est ainsi possible dans une gamme de concentration de 400 nmol.L^{-1} à $100 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$, ce qui correspond à 7,2 ppb à 1,8 ppm. Avec un prototype mis au point par les chercheurs du CEA-LETI au cours du projet COVADIS, il a été montré que le remplacement de la source d'excitation par une diode électroluminescente ainsi que l'utilisation de fibres optiques et d'une durée d'excitation plus longue de 700 s, pouvaient contribuer à diminuer la limite de détection à 4,5 ppt.

Cependant, dans des milieux plus complexes comportant notamment les autres métabolites marqueurs de *Mycobacterium Tuberculosis*, nous avons montré qu'une interférence destructive a lieu et qu'elle est uniquement liée à une compétition entre l'acide nicotinique et ces composés pour l'absorption des photons d'excitation, car tous absorbent dans le même domaine de longueur d'onde. L'acide benzoïque induit quant à lui une interférence constructive, car il peut ligander Tb(III) et lui transférer par voie non radiative l'énergie d'excitation. Dans des milieux encore plus complexes que sont les milieux biologiques (urine, salive, condensat d'haleine) que nous avons également explorés, le même phénomène est observé. Dans ces milieux liquides, le condensat d'haleine s'est révélé le moins perturbateur. Ce constat nous a amené à penser qu'une détection de l'acide nicotinique dans la phase gazeuse pourrait être envisageable. Parmi tous les marqueurs étudiés, l'acide nicotinique est de loin le moins volatil. Il est ainsi envisageable de séparer les marqueurs en piégeant dans un premier temps les composés les plus volatils, puis d'acidifier et chauffer le condensat d'haleine pour favoriser le passage de l'acide nicotinique dans la phase vapeur. Cette stratégie impliquerait l'utilisation de plusieurs capteurs nanoporeux pour différents usages. Parmi les composés volatils figurent également la vapeur d'eau et le gaz carbonique dont la présence à des concentrations très élevées dans l'haleine, respectivement de 60000 et 40000 ppm, pourrait affecter la formation des complexes Tb(III)/AN dans une matrice nanoporeuse, notamment en influant sur le pH intrapore.

La seconde étape a donc porté sur la production de diverses matrices nanoporeuses avec pour objectif de produire des matrices avec des nanopores acides, neutres ou basiques et d'explorer la variation du pH intrapore lorsque ceux-ci piègent de la vapeur d'eau ou/et du gaz carbonique. Trois matrices ont été synthétisées à cet effet avec différentes proportions des deux précurseurs, le tétraméthoxysilane (TMOS) et l'aminopropyle triméthoxysilane (APTES), avec du TMOS pur et des proportions molaires TMOS/APTES égales 97/3 et 80/20. Pour déterminer le pH intrapore des matrices et comprendre comment ce dernier peut régir les équilibres acido-basiques de l'acide nicotinique et des marqueurs d'intérêt, nous avons utilisé comme sonde de pH un colorant, le bleu de bromothymol, dont le pKa égal à 7,1 est proche de la neutralité.

Les études d'exposition à la vapeur d'eau de ces diverses matrices vierges et dopées de bleu de bromothymol ont permis de mettre en exergue de nombreux résultats importants. Nous avons montré avec l'exposition des matrices en mode dynamique à des mélanges gazeux à différents taux d'humidité que les premières molécules d'eau piégées contribuent dans un premier temps à la solvatation du bleu de bromothymol avant de solvater les groupements silanol résiduels et les groupements amine de l'APTES dans les pores contenant le colorant. Ces effets sont visibles grâce au déplacement bathochrome de la bande d'absorption du BBT et précèdent les équilibres de protonation des groupements amine de l'APTES et de déprotonation des groupements silanol. Ces derniers équilibres imposent le pH intrapore de la matrice. Le pH intrapore peut ainsi être varié de

4,75 à 6,3 et 8,15 respectivement pour les matrices acides de TMOS et celles incorporant des groupements amine en proportion croissante. Nous avons également montré que le pH intrapore peut aussi évoluer lors de la dissolution de CO₂ gazeux dans la matrice. L'acidification d'une matrice par l'acide carbonique est cependant mineure comparativement à celle induite par la déprotonation des groupements silanol. En utilisant les paramètres de porosité déterminés à partir des isothermes d'adsorption d'azote de la matrice TMOS/APTES 97/3, nous avons pu estimer le nombre de molécules d'eau présentes dans les pores vides et dans les pores pouvant contenir le BBT lorsque la matrice est saturée d'eau. Ce nombre, de 150 à 3000 molécules par pore selon la taille des pores, est suffisamment élevé pour permettre la déprotonation des groupements SiOH, la protonation des groupements amine de l'APTES et la stabilisation des espèces chargées pour l'établissement du pH intrapore. Par ailleurs, nous avons également montré la possibilité de quantifier la quantité d'eau piégée dans une matrice nanoporeuse par une mesure d'absorbance des bandes d'absorption proche-IR de SiOH liés aux molécules d'eau. De même, il est possible de déterminer l'affinité d'un matériau pour l'eau par une mesure de la vitesse de croissance de l'intensité de ces bandes en fonction du temps d'exposition.

Les données acquises sur le pH intrapore ont été prises en compte par la suite dans la troisième étape d'élaboration des films minces et des matrices nanoporeux dopés de Tb(NO₃)₃. Les matrices sont dans ce cas produites à partir des précurseurs TMOS/APTES 97/3 dans un sol tamponné à l'hexamine à un pH de 6,4. Pour exposer ces matériaux à des mélanges gazeux calibrés d'acide nicotinique, une quatrième étape a concerné la mise au point et l'optimisation d'un dispositif de génération de vapeur d'acide nicotinique. Celui-ci est basé sur la méthode de strippage de molécules gazeuses à l'interface gaz liquide dans une colonne garnie d'anneaux de Raschig. Avec cette méthode, une gamme de concentration de 60 à 200 ppb peut être obtenue en changeant la concentration de la solution mère d'acide nicotinique de départ.

Dans la dernière étape, avec l'exposition des matrices TMOS/APTES 97/3 dopées de Tb(NO₃)₃ et d'hexamine, nous avons montré que les complexes présents en solution, Tb(Hexamine)₃(NO₃)(H₂O) et Tb(Hexamine)₄(H₂O) se retrouvent dans les pores des matrices solides, monolithes ou films minces. En solution, ces deux espèces ont une même durée de vie de luminescence de 390±30 μs. Dans les matrices, deux populations coexistent dont les maxima de luminescence légèrement décalés sont centrés à 543 et 550 nm. Leur durée de vie en milieu solide confiné dans les nanopores dépend fortement du degré d'hydratation des matrices. Ainsi, lorsque les pores sont totalement asséchés, la molécule d'eau de coordination est remplacée soit par un groupement résiduel Si-OH présent à la surface des pores soit par le groupement amine de l'APTES. Ces interactions privilégiées confèrent aux complexes Tb(Hexamine)₄(HOSi-O-Si)- ou/et Tb(Hexamine)₄(NH₂-CH₂-CH₂-CH₂-Si-O-Si)- une rigidité, qui réduit le couplage vibronique de Tb(III) excité avec les oscillateurs OH de SiOH, et CN de l'hexamine et de l'aminopropyle avec pour conséquence une augmentation de la durée de vie de ces espèces. On trouve ainsi des durées de vie fortement augmentée de 0,78±0,1 et 2,0±0,2 ms que nous avons attribuées respectivement à ces complexes « libres » dans des pores de grande taille ou « figés » dans les pores de petite taille. Lorsque les matrices sont fortement hydratées, la protonation du groupement aminopropyle et la déprotonation de SiOH peuvent avoir lieu et les molécules d'eau en fort excès peuvent de nouveau se coordonner au Tb(III). On trouve de nouveau les deux populations d'espèces luminescentes avec des durées de vie raccourcies de 0,39±0,13 et 1,2±0,2 ms. La première qui correspond aux espèces

« libres » $Tb(Hexamine)_3(NO_3)(H_2O)$ ou $Tb(Hexamine)_4(H_2O)$ dans les pores larges contenant une grande concentration de molécules d'eau est très proche de celle obtenue en solution aqueuse.

Similairement à la phase liquide, nous avons montré que la complexation de l'acide nicotinique avec $Tb(III)$ est aussi très efficace en milieu confiné. Elle conduit à la formation de complexes fortement luminescents dont l'intensité de luminescence augmente avec la concentration d'acide nicotinique piégé dans la matrice. La présence d'un autre marqueur beaucoup plus volatil et fortement absorbant à 260 et 266 nm, le nicotinate de méthyle, interfère fortement dans la détection de l'acide nicotinique en absorbant tous les photons d'excitation. La détection de l'acide nicotinique en phase vapeur dans les mélanges complexes de vapeurs de marqueurs semble donc compromise. Une alternative à explorer serait de piéger en amont l'eau ainsi que tous les marqueurs plus volatils que l'acide nicotinique dans un condensat d'haleine. Les marqueurs que nous avons étudiés ont des valeurs de constante de Henry 900 à 2800 fois supérieures à celle de l'acide nicotinique, respectivement pour les composés les moins volatils (méthoxybiphényle) ou plus volatils (nicotinate de méthyle). Cette stratégie serait donc potentiellement réalisable en deux étapes. Dans une 1^{ère} étape, divers matériaux poreux seront utilisés pour le piégeage des marqueurs et d'une grande partie de l'eau. Puis, dans une 2^{ème} étape, le condensat d'haleine pourra être acidifié et chauffé pour libérer l'acide nicotinique en phase vapeur et le collecter dans les matrices dopées de $Tb(III)$ et d'hexamine pour le détecter par luminescence. Il est également possible d'envisager le piégeage des COV les plus volatils avec des matériaux poreux puis une analyse du crachat liquide en utilisant un appareillage plus performant tel que le prototype du CEA-LETI pour la mesure de l'acide nicotinique en phase liquide.

Annexes

Liste des produits chimiques utilisés

Nom du composé	N° CAS	N°lot / Fournisseur
Nitrate de terbium pentahydraté	57584-27-7	Sigma Aldrich
Acide nicotinique	59-67-6	Sigma Aldrich
Hexaméthylentétramine	100-97-0	Sigma Aldrich
Nicotinate de méthyle	93-60-7	Sigma Aldrich
p-anisate de méthyle	121-98-2	Sigma Aldrich
phénylactétate de méthyle	101-41-7	Sigma Aldrich
O-phenylanisole (2-methoxy biphenyl)	86-26-0	TCI
Acide benzoïque	65-85-0	Sigma Aldrich
Acide chlorhydrique 37 %	7647-01-0	Sigma Aldrich
Acide acétique	64-19-7	Sigma Aldrich
Acétate de sodium	127-09-3	Sigma Aldrich
Phosphate de potassium monobasique	7778-77-0	Sigma Aldrich
Phosphate de potassium dibasique	7758-11-4	Sigma Aldrich
TMOS (Tetraméthylorthosilicate)	681-84-5	n° lot : A0317547, ACROS organics
APTES (3-aminopropyltriéthoxysilane)	1322-56-5	n° lot : A0262895, ACROS organics
Méthanol	67-56-1	n° lot 154903, Sigma Aldrich
Bleu de bromothymol	76-59-5	n° lot : 26996KH-278, Sigma Aldrich
Hydroxyde de sodium	1310-73-2	Sigma Aldrich
Eau de ionisée	7732-18-5	Millipore, 18.2 mΩ
Azote liquide	7727-37-9	Air liquide
Ethanol	64-17-5	n° lot : 13E310515, VWR chemicals
Argon 4.5	7440-37-1	Messer

ANNEXE DU CHAPITRE II

I. Etude de la complexation des marqueurs avec Tb^{3+} en solution

I.1 Mesures d'absorbance en solution

Les mesures d'absorbance en solution sont faites avec un spectrophotomètre UV-visible Cary-3E de Varian. Cet appareil est muni de deux lampes couvrant l'UV et le visible. Le changement de lampe est fixé à 350 nm. L'acquisition est faite entre 200 et 800 nm, avec un pas de 1 nm.

I.2 Mesures de luminescence avec le fluorimètre-phosphorimètre

Les mesures de luminescence sont effectuées avec un fluorimètre-phosphorimètre Fluorolog® 3 model FL3-12 de Horiba Jobin-Yvon. L'appareil est équipé d'un phosphorimètre 1934 D. La source de photon d'excitation du fluorimètre est une lampe au xénon de 450 W et la source d'excitation du phosphorimètre est une lampe au xénon pulsée de 20 W. Les mesures de phosphorescence nécessitent de définir les paramètres suivants :

- Range, qui définit la fenêtre de longueurs d'onde d'acquisition.
- Delay after flash (DAF), qui désigne la durée qui s'écoule entre le début d'un flash de la lampe et le début de l'acquisition du signal. DAF correspond donc au délai avant ouverture de la fenêtre d'acquisition.
- Sample window (SW), qui définit la durée d'acquisition du signal émis. Il y a acquisition du signal après chaque flash de la lampe, à la fin du delay after flash.
- Time per flash (TPF), qui correspond à la durée d'un flash de la lampe.
- Number of flash (NF), qui désigne le nombre de flash de la lampe pour chaque point de mesure.
- Slits, qui désigne les fentes qui contrôlent la résolution spectrale en excitation et en émission.
- Front Face : l'émission de l'échantillon est collectée en mode frontal avec un angle de 45 degrés (utilisée pour les manip sur films ou pour les solutions très colorées)
- Right Angle (RA) : l'émission de l'échantillon est collectée perpendiculairement à la direction de l'excitation (utilisation en routine pour les solutions peu colorées ou transparentes).

La Figure 125 présente une séquence d'acquisition de phosphorescence

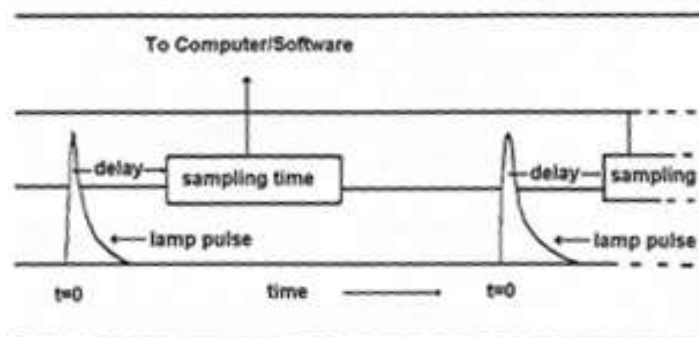


Figure 125. Schéma d'une séquence d'acquisition de phosphorescence.

Les paramètres utilisés pour les mesures de luminescence sont présentés dans le Tableau 40 :

Tableau 40. Paramètres d'acquisition de la luminescence.

Range, nm	Delay After Flash, ms	Sample window, ms	Time per flash, ms	Number of flashes	Slits exc/em*, nm
530-570	0,03	2	50	50	5/2

* valeurs de fentes ont été utilisées pour l'étude de la luminescence en solution et sur matrices de 1 mm d'épaisseur. Les valeurs de fentes étaient de 10 et 5 nm pour les études de couches minces.

Les mesures de luminescence en solution ont été effectuées avec une collecte des photons d'émission perpendiculairement aux photons d'excitation (mode Right Angle). Celles pour des matrices solides ont été effectuées avec collecte des photons d'émission sur la face avant avec un angle de 45° par rapport au faisceau d'excitation (mode Front Face). Deux filtres passe-haut WG 320 et WG 360 ont été utilisés pour éliminer la lumière d'excitation réfléchiée et son harmonique du second ordre.

I.3 Préparation des solutions de réactifs pour les mesures de luminescence de Tb³⁺ avec le fluorimètre-phosphorimètre

La luminescence de Tb³⁺ a été étudiée en milieux aqueux tamponnés et non tamponnés à divers pH 4, 4,75, 5 et 6,4. Le Tableau 41 résume les réactifs utilisés et les volumes et concentrations correspondants.

Tableau 41. Conditions opératoires pour l'obtention de solutions tamponnées.

Solution	[C] solution mère, mol.L ⁻¹	Volume prélevé, mL	[C] finale, mol.L ⁻¹	Volume total, mL
Eau déminéralisée				3
Acide chlorhydrique	0,102	2,94	0,1	
Hydroxyde de sodium				
Tampons acétate				
hexamine	0,1429		0,14	
Tb(NO ₃) ₃	0,012	0,05	2.10 ⁻⁴	
Acide nicotinique	0,00123	0,01	4,1.10 ⁻⁶	

La luminescence de Tb³⁺ a également été étudiée en fonction de la concentration de nitrate de terbium dans des solutions aqueuses tamponnées à l'hexamine, à pH=6,4. Les préparations sont détaillées dans le Tableau 42.

Tableau 42. Conditions pour la préparation de solutions de Tb³⁺ à différentes concentrations dans des milieux tamponnés à l'hexamine

Solution	Concentration solution mère, mol.L ⁻¹	volume prélevé, mL	Volume total, mL	Concentration finale, mol.L ⁻¹
Hexamine pH 6,4	0,1429	2,94	3	0,14
Nitrate de terbium	0,0025	0,06		5.10 ⁻⁵
	0,005			1.10 ⁻⁴
	0,01			2.10 ⁻⁴
	0,05			1.10 ⁻³
	0,1			2.10 ⁻³
	0,2			4.10 ⁻³

	0,3			6.10-3
	0,4			8.10-3

L'influence de la concentration en hexamine sur la luminescence de Tb^{3+} et de Tb^{3+}/AN a été étudiée. La préparation des solutions correspondantes est résumée dans le Tableau 43.

Tableau 43. Préparation de solutions de Tb^{3+} 200 $\mu mol.L^{-1}$ dans des solutions aqueuses tamponnées avec diverses concentrations d'hexamine à pH 6,4, en présence d'AN 4,1 $\mu mol.L^{-1}$.

Solution	[C] solution mère, $mol.L^{-1}$	Volume prélevé, mL	[C] finale, $mol.L^{-1}$	Volume total, mL
hexamine	0,0102	2,94	0,01	3
	0,102		0,1	
	0,1429		0,14	
	0,5102		0,5	
	0,7244		0,71	
	1,4285		1,4	
Nitrate de terbium	0,012	0,05	2.10-4	
AN	0,00123	0,01	4,1.10-6	

Pour l'étude de la luminescence du complexe Tb^{3+} en fonction de la concentration d'AN, plusieurs solutions ont été préparées selon les conditions résumées dans le Tableau 44. Deux séries ont été préparées avec 2 concentrations différentes d'hexamine 0,01 et 0,14 $mol.L^{-1}$.

Tableau 44. Concentrations des réactifs pour le dosage de l'acide nicotinique.

Solution	[C] solution mère, $mol.L^{-1}$	volume prélevé, mL	Volume total, mL	[C]finale, $mol.L^{-1}$
Hexamine pH 6,4	0,0103	2,9	3	0,01
	0,1448			0,14
Nitrate de terbium	0,01	0,06		2.10-4
	0,2			4.10-3
Acide nicotinique	7,5.10-7	0,04		1.10-8
	7,5.10-6			1.10-7
	1,5.10-5			2.10-7
	3.10-5			4.10-7
	3,75.10-5			5.10-7
	7,50.10-5			1.10-6
	2,25.10-4		3.10-6	
	7,50.10-4		1.10-5	
	3,75.10-3		5.10-5	
	7,50.10-3		1.10-4	
3,75.10-2	5.10-4			

L'influence de la présence des autres marqueurs de la tuberculose (le nicotinate de méthyle, le p-anisate de méthyle, le phénylacétate de méthyle et le 2-méthoxy biphényle) sur la luminescence de Tb^{3+} et du complexe Tb^{3+}/AN a été étudiée en fonction de la concentration de chaque marqueur.

Des solutions de différentes concentrations étaient préparées pour ajouter un volume constant de 20 μL dans la cuve d'analyse (Tableau 45).

Tableau 45. Volume de réactifs pour l'étude de la luminescence de Tb^{3+} et Tb^{3+}/AN en présence des autres marqueurs.

Solution	Concentration solution mère, mol.L^{-1}	volume prélevé, mL	Volume total, mL	Concentration finale, mol.L^{-1}
Hexamine pH 6,4	0,1448	2,9		0,14
Nitrate de terbium	0,01	0,06		$2,0 \cdot 10^{-4}$
Acide nicotinique	$4,50 \cdot 10^{-4}$	0,02		$3,0 \cdot 10^{-6}$
marqueur	0	0,02	3	0
	$1,50 \cdot 10^{-6}$			$1 \cdot 10^{-8}$
	$1,5 \cdot 10^{-5}$			$1 \cdot 10^{-7}$
	$7,5 \cdot 10^{-5}$			$5 \cdot 10^{-7}$
	$1,5 \cdot 10^{-4}$			$1 \cdot 10^{-6}$
	$4,5 \cdot 10^{-4}$			$3 \cdot 10^{-6}$
	$7,5 \cdot 10^{-3}$			$5 \cdot 10^{-5}$
	$3 \cdot 10^{-2}$			$2 \cdot 10^{-4}$

Une étude similaire a été menée en ajoutant des concentrations croissantes d'acide benzoïque dans le milieu. Un volume constant de 20 μL de solution d'acide benzoïque était ajouté dans l'échantillon contenant 60 μL d'une solution de Tb^{3+} et 20 μL d'une solution d'acide nicotinique.

Tableau 46. Volume de réactifs pour l'étude de la luminescence de Tb^{3+} en présence d'AN et de l'acide benzoïque

Solution	Concentration solution mère, mol.L^{-1}	volume prélevé, mL	Volume total, mL	Concentration finale, mol.L^{-1}
Hexamine pH 6,4	0,1448	2,9		0,14
Nitrate de terbium	0,01	0,06		$2,0 \cdot 10^{-4}$
Acide nicotinique	$4,5 \cdot 10^{-4}$	0,02		$3,0 \cdot 10^{-6}$
Acide benzoïque	0	0,02	3	0
	$1,5 \cdot 10^{-6}$			$1,0 \cdot 10^{-8}$
	$1,5 \cdot 10^{-5}$			$1,0 \cdot 10^{-7}$
	$1,5 \cdot 10^{-4}$			$1,0 \cdot 10^{-6}$
	$4,5 \cdot 10^{-4}$			$3,0 \cdot 10^{-6}$
	$1,5 \cdot 10^{-3}$			$1,0 \cdot 10^{-5}$
	$1,2 \cdot 10^{-2}$			$8,0 \cdot 10^{-5}$

I.1 Détermination de la limite de détection de AN

I.1.1 Méthode de détermination de la limite de détection

La limite de détection d'une méthode d'analyse désigne la plus faible concentration d'analyte induisant un signal différenciable du bruit de fond de la méthode d'analyse. La limite de détection, LD est définie par l'équation 1 :

$$LD = 3 \sigma_{\text{blanc}} + \langle \text{blanc} \rangle \quad \text{équation 1}$$

$\langle \text{blanc} \rangle$ étant la moyenne sur les n mesures du signal du blanc et σ_{blanc} l'écart-type sur ces n mesures. Dans notre cas, la limite de détection désigne la plus faible concentration d'acide nicotinique entraînant une augmentation significative du signal de phosphorescence du terbium. Dans ces conditions, le signal du blanc est l'aire de phosphorescence du nitrate de terbium en absence d'acide nicotinique. L'équation 1 devient alors :

$$LD = 3 \sigma_{\text{MS}} + \langle \text{MS} \rangle \quad \text{équation 2}$$

$\langle \text{MS} \rangle$ étant la moyenne sur les n mesures du signal de la molécule sonde MS et σ_{MS} l'écart-type sur ces n mesures. Nous observons une augmentation de la phosphorescence du complexe. Ce qui nous intéresse est la variation de luminescence induite par l'ajout d'acide nicotinique que nous appelons ΔL et qui est définie par l'équation 3 :

$$\Delta L = \langle \text{AN-MS} \rangle - (3 \sigma_{\text{MS}} + \langle \text{MS} \rangle) \quad \text{équation 3}$$

A partir de cette formule nous pouvons définir la limite de détection comme la plus faible concentration d'acide nicotinique pour laquelle la variation de phosphorescence est strictement positive.

$$LD = \Delta L > 0 \rightarrow \langle \text{AN-MS} \rangle - (3 \sigma_{\text{MS}} + \langle \text{MS} \rangle) > 0 \quad \text{équation 4}$$

La limite de détection de la méthode avec les deux concentrations testées a été estimée en utilisant les données des figures présentant la linéarité de la méthode. Dans chaque cas, l'équation 3 a été appliquée pour obtenir le graphe différence d'aire de pic = f(concentration d'acide nicotinique). La première valeur de ce graphe présente au-dessus de l'axe des abscisses, écart-type compris, détermine la limite de détection de la méthode.

I.1.2 Détermination de la limite de détection en solution d'hexamine 0,14 mol.L⁻¹ avec une concentration de Tb³⁺ de 200 μmol.L⁻¹.

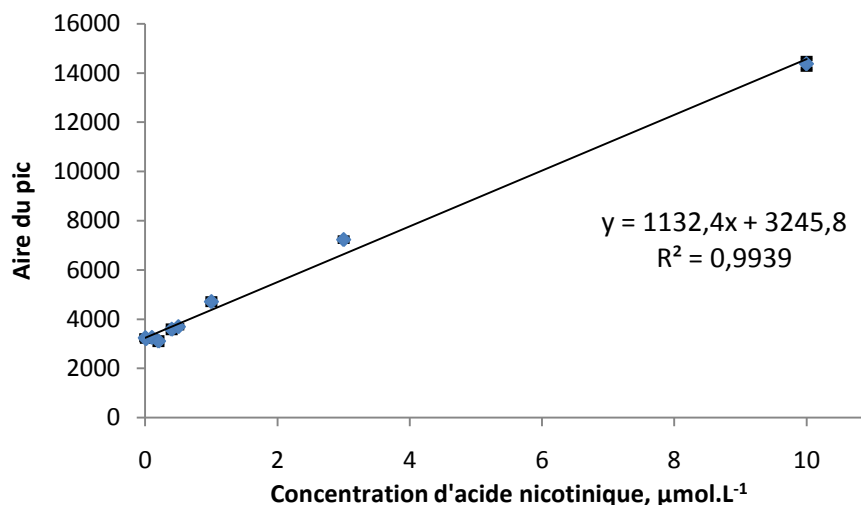


Figure 126. Gamme de linéarité de la méthode de détection de l'acide nicotinique dans une solution d'hexamine 0,14 mol.L⁻¹ tamponnée à pH 6,4 avec une concentration de Tb³⁺ de 200 μmol.L⁻¹.

La limite de détection de l'acide nicotinique avec les différentes conditions opératoires testées précédemment a été évaluée suivant la méthode décrite au paragraphe I.1.1. Les résultats présentés ont été obtenus avec une concentration de molécule-sonde de 200 μmol.L⁻¹.

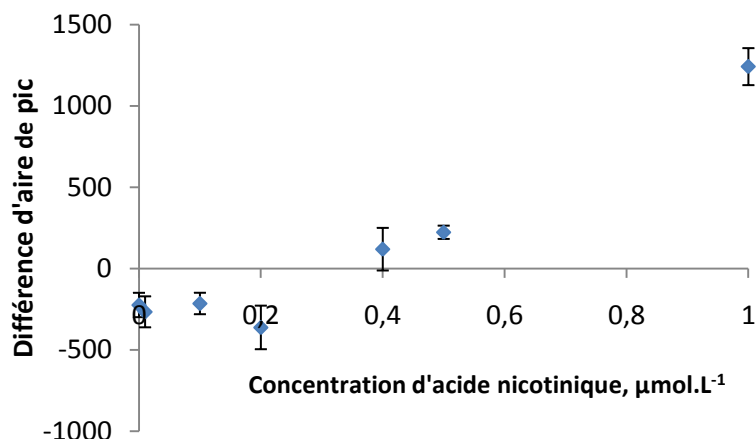


Figure 127. Différence d'aire de pic (Δ) en fonction de la concentration d'acide nicotinique pour la détermination de la limite de détection de l'acide nicotinique. Tb³⁺ = 200 μmol.L⁻¹. Tampon hexamine 0,14 mol.L⁻¹ pH 6,4.

La première valeur lue sur Figure 127 satisfaisant les conditions de la relation 4 est 500 nmol.L⁻¹. La limite de détection de la méthode peut être estimée à 500 nmol.L⁻¹.

I.1.3 Limite de détection en solution d'hexamine 0,14 mol.L⁻¹ en utilisant une concentration de Tb(NO₃)₃ de 4 mmol.L⁻¹.

Les résultats présentés en Figure 128 ont été obtenus avec une concentration de Tb³⁺ de 4 mmol.L⁻¹.

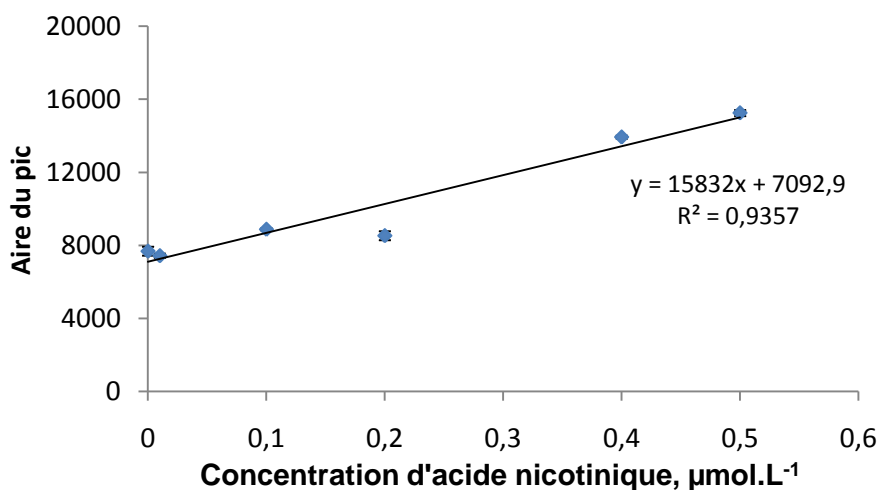


Figure 128. Gamme de linéarité de la méthode de détection de l'acide nicotinique dans une solution d'hexamine $0,14 \text{ mol.L}^{-1}$ tamponnée à pH 6,4 avec une concentration de Tb^{3+} de 4 mmol.L^{-1} .

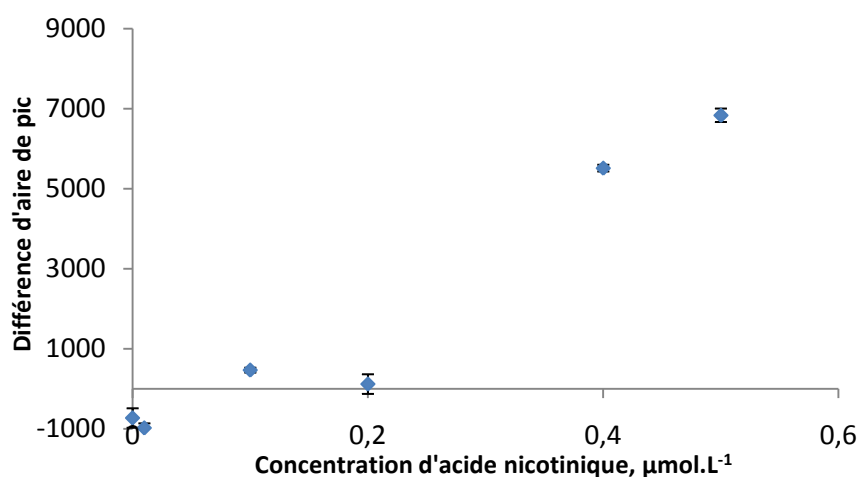


Figure 129. Différence d'aire de pic (ΔA) en fonction de la concentration d'acide nicotinique. $\text{Tb}^{3+} = 4 \text{ mmol.L}^{-1}$. Tampon hexamine $0,14 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 6,4.

La première valeur lue sur la Figure 129 satisfaisant les conditions de la relation 4 est 100 nmol.L^{-1} . La limite de détection de la méthode peut être estimée à 100 nmol.L^{-1} . Cette valeur est inférieure aux valeurs obtenues par Krasnova dans son étude : 240 nmol.L^{-1} avec la méthode de vitesse initiale et 330 nmol.L^{-1} avec la mesure à l'équilibre.

I.1.4 Limite de détection en solution d'hexamine $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$ en utilisant une concentration de $\text{Tb}(\text{NO}_3)_3$ de 200 µmol.L^{-1} .

La détermination de la limite de détection de la méthode a été effectuée en milieu tampon hexamine $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 6,4 avec une concentration de Tb^{3+} de 200 µmol.L^{-1} .

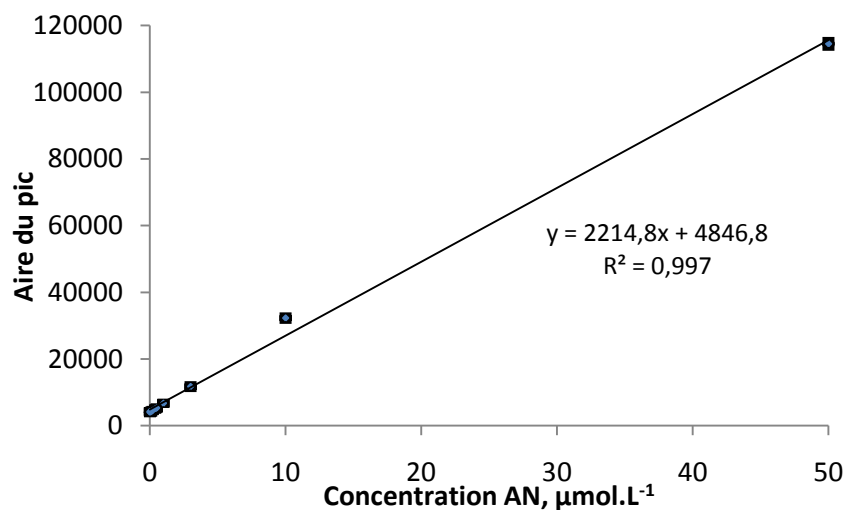


Figure 130. Gamme de linéarité de la méthode de détection de l'acide nicotinique dans une solution d'hexamine $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$ tamponnée à pH 6,4 avec une concentration de Tb^{3+} de $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

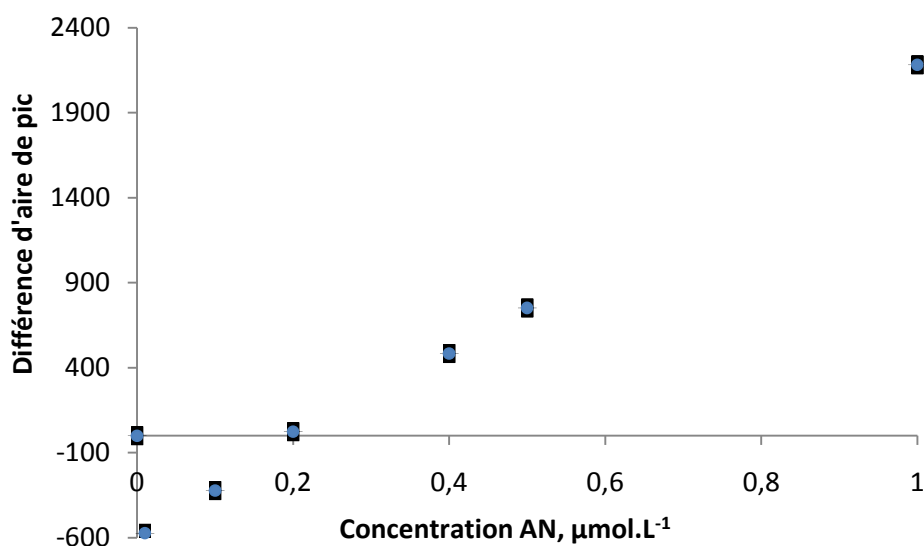


Figure 131. Différence d'aire de pic (ΔL) en fonction de la concentration d'acide nicotinique. $\text{Tb}^{3+} = 200 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Tampon hexamine $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 6,4.

La première valeur lue sur Figure 131 satisfaisant les conditions de la relation 4 est 400 nmol.L^{-1} . La limite de détection de la méthode peut être estimée à 400 nmol.L^{-1} .

Le Tableau 47 récapitule les valeurs de limite de détection déterminées.

Tableau 47. Valeurs de limite de détection en fonction des conditions expérimentales.

[C] Tb^{3+} , mmol.L^{-1}	[C] hexamine, mol.L^{-1}	Limite de détection, $\mu\text{mol.L}^{-1}$
0,2	0,01	0,4
	0,14	0,5
4	0,14	0,1

I.2 Etude en milieux biologiques avec le fluorimètre-phosphorimètre Horiba/Jobin-Yvon

L'étude de la luminescence de Tb(III) et des complexes formés avec l'acide nicotinique a été effectuée dans l'urine, la salive et le condensat d'haleine. Les échantillons d'urine, salive et condensat d'haleine ont été obtenus de manières différentes et ont été fournis par bioMérieux.

Les échantillons d'urine et de salive ont été obtenus à partir d'un seul volontaire.

L'échantillon de condensat d'haleine a été obtenu en faisant souffler plusieurs volontaires, fumeurs et non-fumeurs, dans des flacons de prélèvement refroidis dans de l'azote liquide. Ces différents prélèvements ont ensuite été rassemblés pour obtenir un échantillon unique. Le volume total de l'échantillon de condensat d'haleine était de 1 mL.

Les échantillons de salive et d'urine ont été dilués 100 fois avant étude. L'échantillon de condensat d'haleine n'a pas été dilué.

Pour l'étude, une solution tamponnée d'hexamine $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ à pH 6,4 a été préparée. Un volume de cette solution a été incorporé aux échantillons pour obtenir une concentration d'hexamine en solution de $0,14 \text{ mol.L}^{-1}$ et un pH de 6,4:

- Les échantillons d'urine et de salive étaient dilués dans la solution d'hexamine de manière à obtenir des échantillons de salive et d'urine dilués au centième dans l'hexamine, pour un volume final de 2 mL.
- Un volume de 720 μL de condensat d'haleine a été mélangé à 280 μL de solution d'hexamine pour obtenir une concentration d'hexamine de $0,14 \text{ mol.L}^{-1}$ dans un volume final de 1 mL.

Les échantillons ainsi obtenus ont été étudiés par spectrophotométrie. Pour les études de luminescence de Tb^{3+} dans les échantillons, 40 μL d'une solution de nitrate de terbium à 10 mmol.L^{-1} était ajouté aux échantillons de salive et d'urine, et 20 μL ont été ajoutés à l'échantillon de condensat d'haleine. Pour l'étude de la luminescence du complexe Tb^{3+}/AN , un volume de 1 μL d'une solution d'acide nicotinique à 2 mmol.L^{-1} était ajouté par la suite. Ces conditions sont résumées dans le Tableau 48.

Tableau 48. Volume des réactifs utilisés lors de l'étude en milieux aqueux biologiques

Milieu	Volume utilisé, mL	V(hexamine) $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$, mL	V($\text{Tb}(\text{NO}_3)_3$) $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$, mL	V(AN) 2 mmol.L^{-1} , mL	V _{total} , mL
Urine	0,02	0,56	40	0,001	2
Salive					
Condensat d'haleine	0,72	0,28	2	0,0005	1

I.3 Préparation des solutions pour les mesures de durée de vie de Tb^{3+} avec le dispositif de laser nanoseconde

Les solutions de Tb(III) tamponnées à différentes concentrations d'hexamine ont été irradiées avec un laser Nd-YAG quadruplé en fréquence (exc à 266 nm) et les photons de luminescence ont été collectés avec un photomultiplicateur et transformés en voltage avec divers résistances de charge. Des solutions de concentrations en hexamine comprise entre $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$ et $0,14 \text{ mol.L}^{-1}$ ont été utilisées. La préparation des échantillons est détaillée dans le Tableau 49.

Tableau 49. Volume des réactifs utilisés lors des mesures de durée de vie de luminescence de Tb^{3+} en fonction de la concentration d'hexamine.

Solution	[C] solution mère, mol.L ⁻¹	Volume prélevé, mL	[C] finale, mol.L ⁻¹	Volume total, mL
hexamine	2,04.10 ⁻⁴	2,94	2.10 ⁻⁴	3
	5,1.10 ⁻⁴		5.10 ⁻⁴	
	1,02.10 ⁻³		1.10 ⁻³	
	0,0102		0,01	
	0,1429		0,14	
Tb ³⁺	0,0106	0,0566	2.10 ⁻⁴	

La luminescence du complexe Tb^{3+} /AN a également été collectée en fonction de la concentration d'acide nicotinique dans des solutions tamponnées à l'hexamine à des concentrations de 0,01 et 0,14 mol.L⁻¹. Les différentes concentrations d'acide nicotinique étaient obtenues par des ajouts successifs d'un volume de solution mère d'acide nicotinique. La préparation des échantillons est détaillée dans le Tableau 50.

Tableau 50. Volume des réactifs utilisés lors des mesures de temps de vie de luminescence du complexe Tb^{3+} /AN en fonction de la concentration d'acide nicotinique.

Solution	Concentration solution mère, mol.L ⁻¹	volume prélevé, mL	Concentration finale, mol.L ⁻¹	Volume final, mL
Hexamine pH 6,4	0,0102	2,94	0,01	3
	0,1429		0,14	
Nitrate de terbium	0,0106	0,0566	2,0.10 ⁻⁴	
Acide nicotinique	0,012	0	0	
		1,03.10 ⁻³	4,1.10 ⁻⁶	
		2,5.10 ⁻³	1.10 ⁻⁵	
		7,5.10 ⁻³	3.10 ⁻⁵	
		1,25.10 ⁻²	5.10 ⁻⁵	
		2,5.10 ⁻²	1.10 ⁻⁴	

I.4 Mesure de luminescence avec le dispositif laser nanoseconde

Pour la mesure de durée de vie de luminescence nous avons utilisé un dispositif de photolyse éclair nanoseconde (absorption transitoire). La figure 8 montre un schéma de la partie du dispositif qui a été utilisée pour effectuer mes expériences. La source d'excitation est un laser Nd:YAG (QuantaRay) qui génère des impulsions nanoseconde à 1064 nm. A l'aide des cristaux non-linéaires (KDP) les impulsions infra-rouge sont converties en impulsions ultraviolettes de longueur d'onde 266 nm. Ces impulsions de 266 nm ont été utilisées pour l'excitation des échantillons. La luminescence a été détectée perpendiculairement par rapport à l'excitation. La sélection de la longueur d'onde de détection (547 nm) a été effectuée par un monochromateur Spex 270M de Jobin-Yvon. Un filtre Schott GG435 a été placé devant le monochromateur pour diminuer la lumière diffusée du laser. Les déclinés de luminescence ont été détectés par un photomultiplicateur Hamamatsu R928 relié à un oscilloscope de 500 MHz (Lecroy WaveRunner 6050).

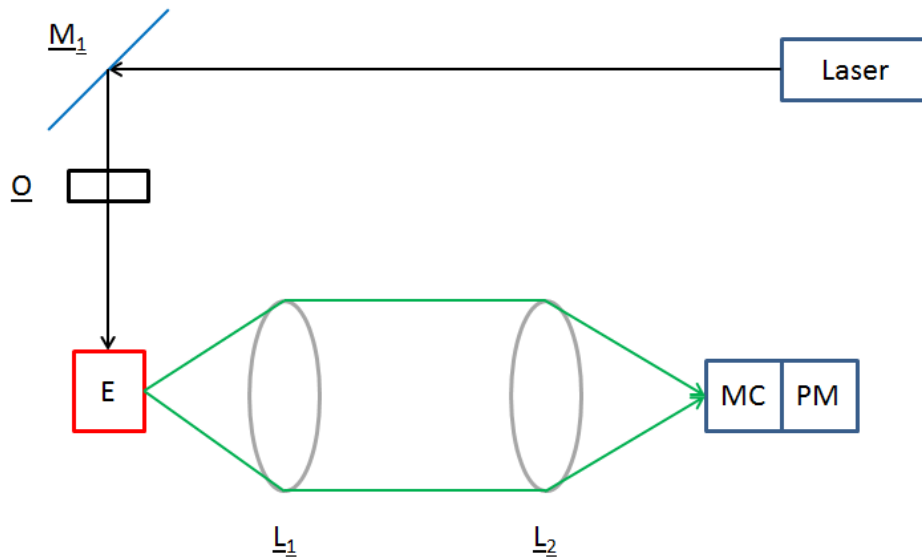


Figure 132. Schéma du dispositif de mesure de luminescence avec le laser nanoseconde.

où M est un miroir, O est un obturateur, E représente l'échantillon à analyser et le porte échantillon, L_1 et L_2 sont des lentilles, MC est un monochromateur et PM un photomultiplicateur.

Les mesures de luminescence en solution ont été effectuées en utilisant des cuves en quartz à quatre faces optiques de 10 mm de côté. Des fentes de dimensions 6x10 mm (hauteur x largeur) ont été utilisées en excitation et en émission (la pièce de gauche sur figure 133) car l'absorbance des échantillons à la longueur d'onde d'excitation était toujours inférieure à 0,5.

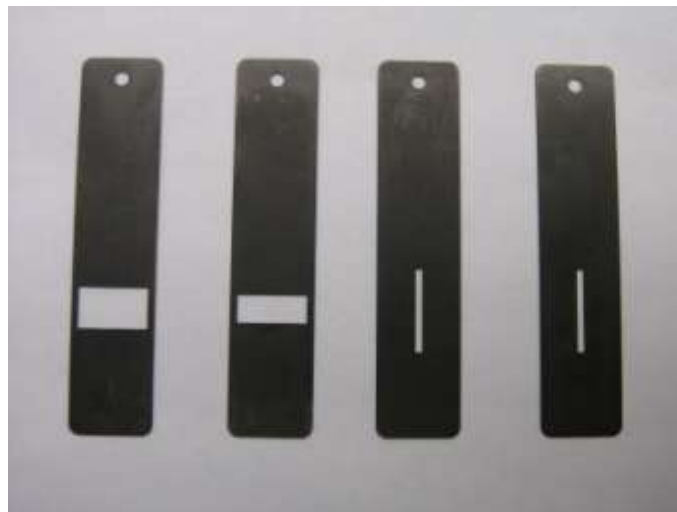


Figure 133. Fentes utilisées pour les mesures de durées de vie de luminescence en solution (les deux premières de gauche) et en matrices nanoporeuses (les deux de droite).

Pour les mesures de luminescence des matrices solides nous avons utilisé un porte-échantillon spécifique (voir Figure 134), qui nous a permis d'utiliser le même porte cuves que pour les expériences sur échantillons liquides. Le monolithe de dimensions (8x5x2 mm) est placé entre les deux pièces de plastique noir qui permettent de le maintenir, la cohésion du bloc étant assurée par trois vis. Des fentes aménagées dans le support permettent le passage du faisceau laser et de la lumière émise. Le monolithe est placé de manière à ce que le laser l'irradie par la tranche soit sur le

plus petit côté du monolithe. (2è photo, la flèche). Le faisceau d'émission est émis par l'ouverture la plus large (le point rouge sur la 2ème photo). Des fentes de dimensions 12x1 mm ont été utilisées en excitation et 4x10 mm en excitation pour l'étude de la luminescence des monolithes, mais la hauteur du volume excité a été limitée à 4-5 mm par le porte échantillon.

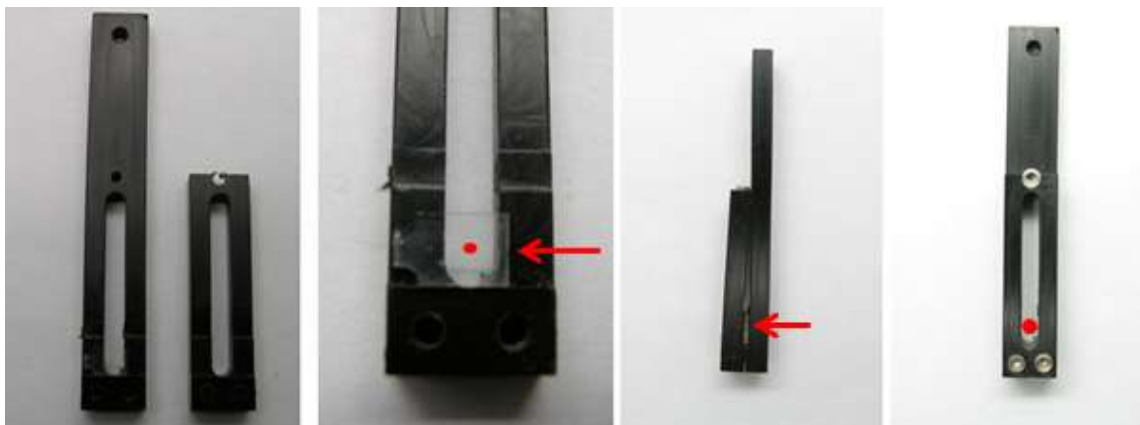


Figure 134. Support porte-monolithe et placement du monolithe. La flèche rouge indique la zone irradiée par le laser, le point rouge indique la face par laquelle est recueillie l'émission.

L'énergie d'excitation du laser était réglée à 1 mJ ($0.33 \text{ MW}\cdot\text{cm}^{-2}$) pour les mesures de luminescence en solution et $0,6 \text{ mJ}$ ($3 \text{ MW}\cdot\text{cm}^{-2}$) pour les mesures sur matrices nanoporeuses.

ANNEXE DU CHAPITRE III

II. Exposition statique des matrices à de la vapeur d'eau saturante

Les mesures d'absorbance dans le domaine UV-proche infrarouge ont été effectuées au moyen d'un spectrophotomètre UV-visible-proche infrarouge Lambda 900 de Perkin Elmer. L'acquisition a été faite entre 300 et 2500 nm, avec un pas de 1 nm. Le support utilisé pour effectuer les mesures d'absorbance de monolithes sur le Lambda 900 est présenté dans la figure 135.



Figure 135. Support porte monolithe utilisé pour les mesures d'absorbance dans le proche IR.

II.1 Matrice TMOS/APTES 80/20 vierge

Les spectres d'absorption collectés dans le proche-IR en fonction du temps sont montrés dans la figure 12. Les vitesses de croissance de l'intensité d'absorption à différentes longueurs d'onde ont été calculées à partir des courbes de variation d'intensité d'absorbance en fonction du temps d'exposition.

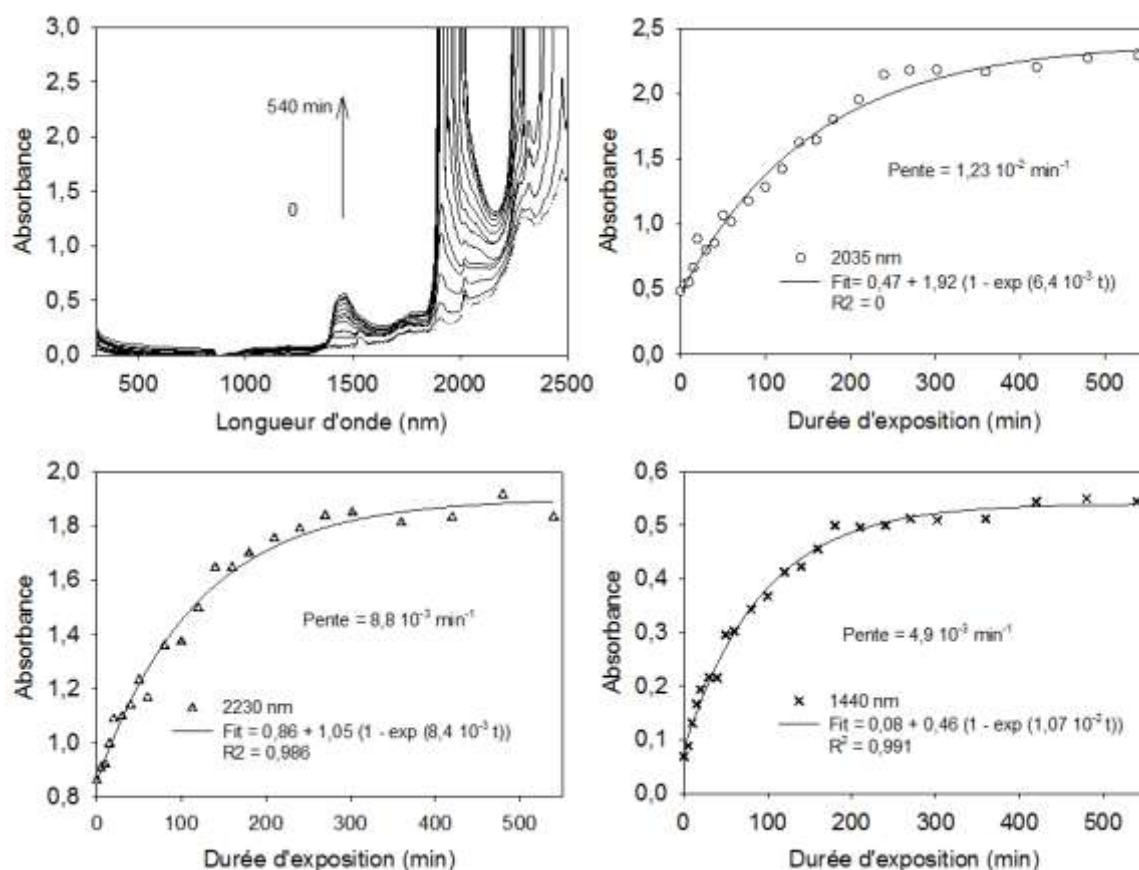


Figure 136. (Haut-gauche) : Evolution du spectre UV-visible et proche-IR d'une matrice TMOS/APTES 80/20 vierge lors de son exposition à de la vapeur d'eau saturante. Les trois cinétiques correspondent à la variation d'absorbance des bandes d'absorption de SiOH associées à l'eau et centrées à 2035, 2230 et 1440 nm en fonction de la durée d'exposition.

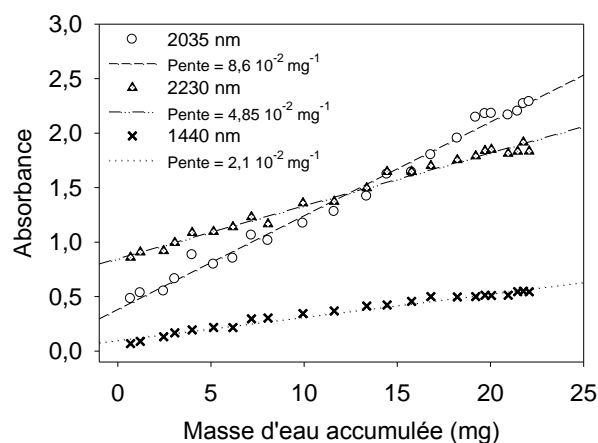


Figure 137. Variation de l'absorbance des bandes centrées à 2035, 2230 et 1440 nm en fonction de la masse d'eau accumulée dans la matrice lors de son exposition à de la vapeur d'eau saturante.

Les mêmes données ont été collectées pour la matrice TMOS/APTES 80/20 dopée de BBT.

II.2 Matrice TMOS/APTES 80/20 dopée de BBT $4,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$

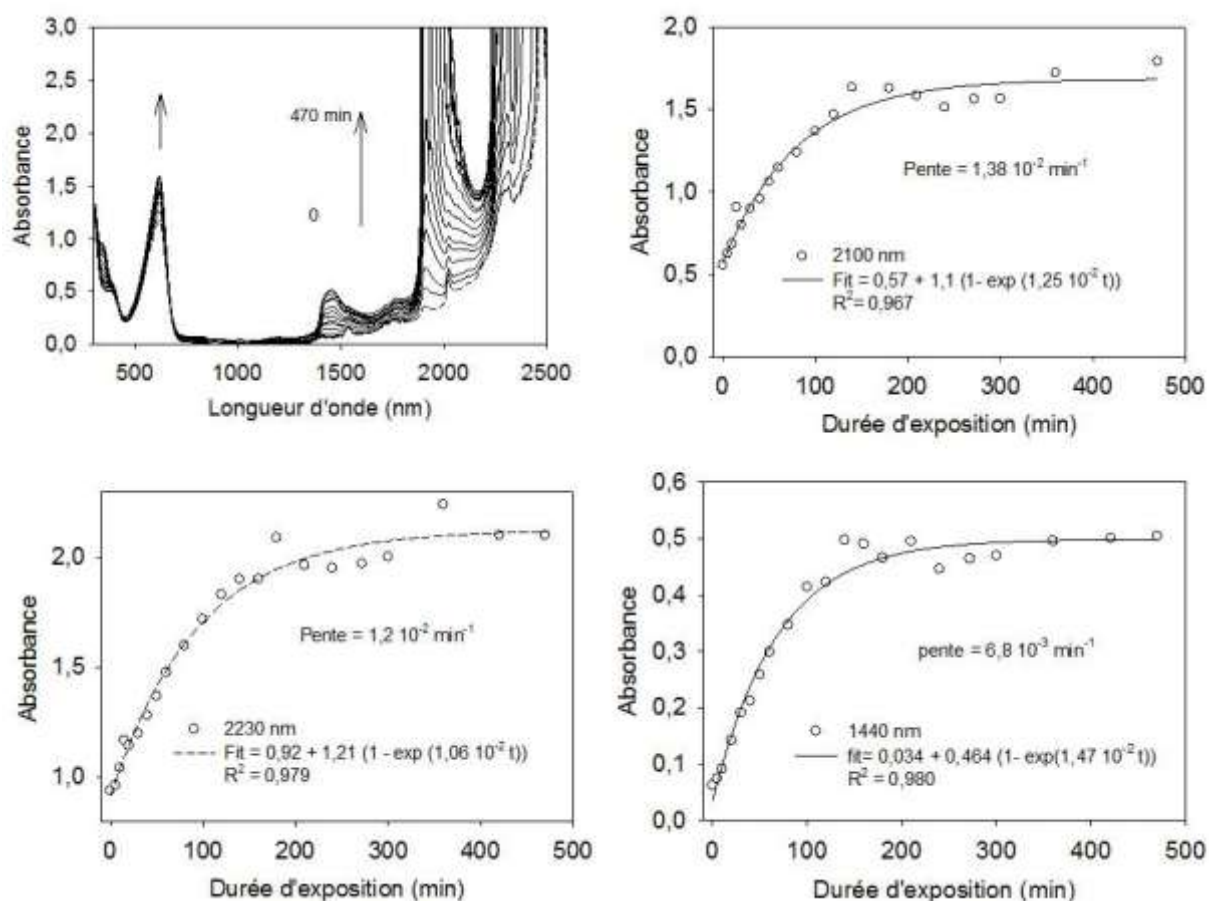


Figure 138. (Haut-gauche) : Evolution du spectre UV-visible et proche-IR d'une matrice TMOS/APTES 80/20 dopée de BBT $4,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ lors de son exposition à de la vapeur d'eau saturante. Les trois cinétiques correspondent à la variation d'absorbance des bandes d'absorption de SiOH associées à l'eau et centrées à 2100 2230 et 1440 nm en fonction de la durée d'exposition.

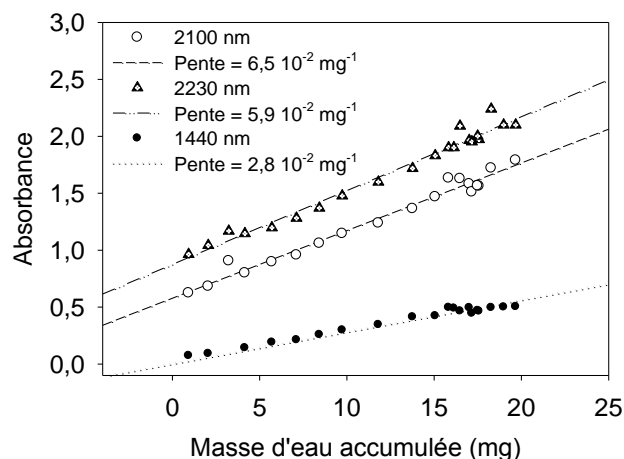


Figure 139. Variation de l'absorbance des bandes centrées à 2100, 2230 et 1440 nm en fonction de la masse d'eau accumulée dans la matrice lors de son exposition à de la vapeur d'eau saturante.

II.3 Principe de la détermination de la porosité par adsorption d'azote à la température de l'azote liquide.

Détermination de la surface spécifique et de la porosité

La surface spécifique et la porosité d'un matériau sont déterminées à partir de l'isotherme d'adsorption d'un gaz inerte adsorbé à la surface des pores d'un matériau à la température de l'azote liquide. L'isotherme d'adsorption est une courbe reliant l'activité du gaz adsorbé en surface d'un solide et l'activité du gaz contenu dans l'atmosphère avec laquelle le solide est en équilibre. L'isotherme d'adsorption est déterminée par adsorption d'un gaz inerte en surface des pores du matériau.

L'adsorption physique n'implique pas de liaison spécifique entre la surface l'adsorbat. Dans le cas de la physisorption, il s'agit d'un phénomène peu énergétique. Il consiste essentiellement en la condensation de molécules sur la surface du solide et est favorisé par l'abaissement de la température, la pression du gaz et la surface spécifique du matériau

Les isothermes d'adsorption-désorption

Principe de la mesure

Le matériau à analyser est d'abord débarrassé des polluants présents dans ses pores par dégazage sous vide ou balayage avec un gaz inerte. Ensuite des ajouts successifs de gaz à adsorber, l'adsorbat, sont effectués. A chaque ajout, un équilibre de pression est établi. Des ajouts d'adsorbat sont faits jusqu'à ce que la pression d'équilibre de l'adsorbat dans le matériau soit atteinte.

Les isothermes d'adsorption peuvent prendre plusieurs formes définies par les paramètres du matériau étudié. Ils ont été regroupés en cinq catégories, chacune correspondant à une distribution de taille des pores différente. L'IUPAC propose comme classification celle initialement étudiée par Brunauer, Deming et Teller. Elle est illustrée dans la figure.

- Les isothermes de type I, également appelé isotherme de Langmuir, sont observés pour des matériaux microporeux et dont la taille des pores est légèrement supérieure au diamètre de l'adsorbat. Il s'agit d'une adsorption essentiellement monomoléculaire

- Les isothermes de type II caractérisent les matériaux non poreux ou macroporeux. Le point d'inflexion apparaît souvent lorsque la première monocouche est adsorbée sur la surface.

Les types III et IV sont rarement rencontrés. Ils correspondent à des énergies d'adsorption inférieures à l'énergie de liquéfaction de l'adsorbat. Le type III est associé à des matériaux non poreux et le type IV à des matériaux contenant des mésopores.

Les isothermes de types IV sont observés pour des poudres contenant des mésopores. Comme pour les types de type II, un point d'inflexion est observé lorsque la première monocouche est adsorbée.

L'isotherme de type VI dites à marche, observée dans le cas d'absorption par des surfaces homogènes énergétiquement et sur lesquelles les couches sont adsorbées se forment l'une après l'autre.

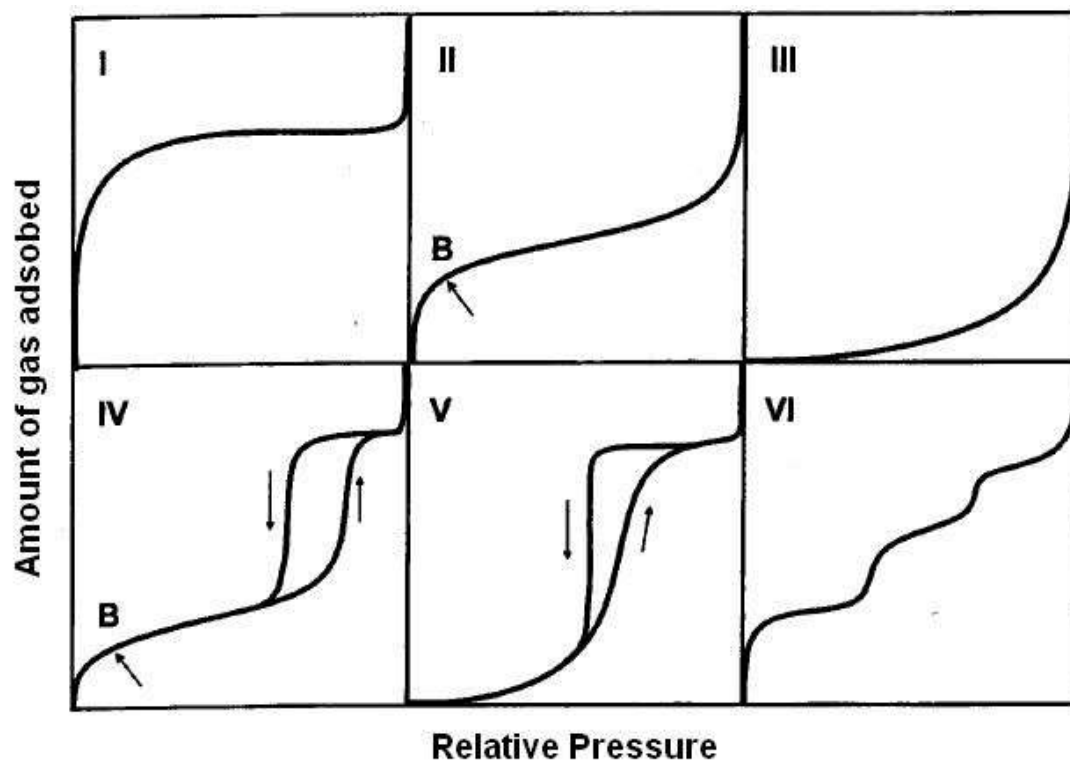


Figure 140. Les différentes formes d'isothermes d'adsorption-désorption

Lors de la désorption, il est fréquent d'observer la formation d'une courbe d'hystérésis. La forme de l'hystérésis, donne alors des informations sur le type de pores présents dans le matériau. Quatre types d'hystérésis ont été définis

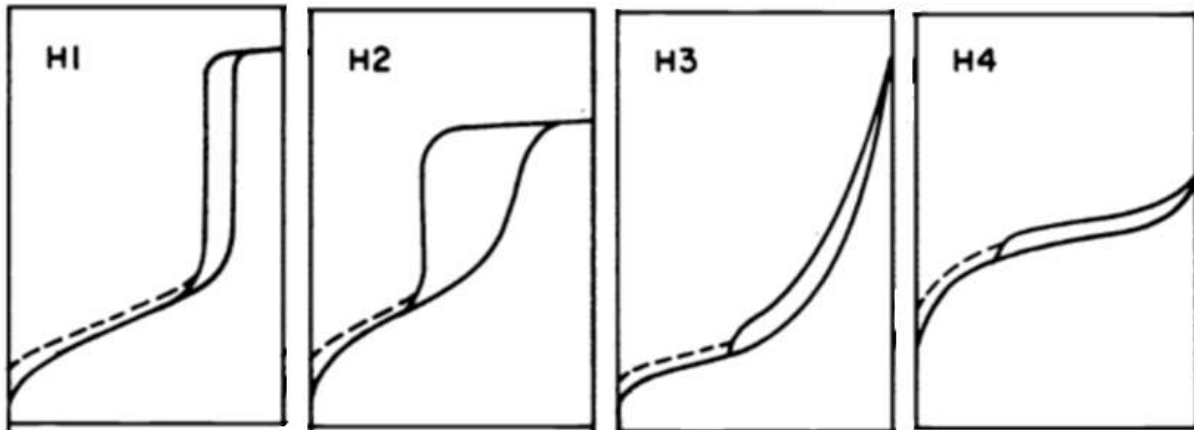


Figure 141. Les différentes hystérésis possibles.

- La boucle de type H1 correspond à une distribution très étroite de mésopores sphériques
- La boucle de type H2 correspond à des mésopores interconnectés
- La boucle de type H3 peut être attribuée à une condensation capillaire s'effectuant dans une texture non rigide et non caractéristique d'une porosité définie. Cette hystérésis est observée dans le cas d'aggrégats du matériau.
- Une boucle de type IV caractérise des matériaux microporeux constitués de feuillets liés entre eux et entre lesquels une condensation capillaire peut se produire.

Surface spécifique

La méthode de Brunauer-Emmett-Teller (BET) est la méthode de détermination la plus utilisée. Son utilisation implique les hypothèses suivantes :

- la surface de l'adsorbant peut être représentée par un ensemble de surface S_0, S_1, \dots Si sur lesquelles sont adsorbées successivement et respectivement 0, 1, 2... n couches monomoléculaires de molécules. Les molécules adsorbées sur une couche sont supposées constituer des sites d'adsorption pour une nouvelle couche, ce qui permet de considérer l'existence d'un très grand nombre de molécules adsorbées, et conduit à une notion statistique de la couche monomoléculaire.
- à tout instant, il existe un équilibre entre la couche d'ordre $i-1$ et celle d'ordre i : le nombre de molécules condensées qui passent d'une couche à la phase vapeur est égal au nombre de molécules qui viennent se condenser sur la couche $i-1$
- la première couche adsorbée est différente des autres : elle subit l'effet de la surface tandis que cet effet est négligeable sur les couches d'ordre supérieur. L'énergie d'adsorption correspondant à la formation de la $i^{\text{ème}}$ couche, E_i , est :
 - égal à l'énergie de liquéfaction EL à partir de la seconde couche ($i > 1$)
 - différent de EL si $i = 1$. Elle dépend alors de l'interaction surface/adsorbant.

La formulation mathématique de ces conditions conduit, après développement, à l'expression suivante

$$\frac{1}{V_A \left(\frac{P_0}{P} \right) - 1} = \frac{1}{V_m C} + \frac{C-1}{V_m C} \left(\frac{P_0}{P} \right) \quad \text{équation 5}$$

où

V_A : volume du gaz adsorbé à la pression relative d'équilibre (P/P_0) en $\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$

V_m : volume du gaz nécessaire pour former la première couche monomoléculaire sur la totalité de la surface en $\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$

C la constante BET relative à l'énergie d'adsorption de la première couche adsorbée. Sa valeur nous renseigne sur l'amplitude des interactions adsorbant/adsorbat.

L'allure des isothermes d'adsorption calculées à partir de l'équation est une droite dans un domaine limité de P/P_0 compris entre 0,05 et 0,35. La procédure BET standard nécessite la connaissance d'au moins trois points dans l'intervalle de pression approprié. Le volume de la première couche d'adsorbat V_m est alors obtenu à partir de la pente et de l'ordonnée à l'origine I de la partie linéaire de l'isotherme.

Nous avons donc

$$s = \frac{C-1}{V_m C} \quad \text{et} \quad I = \frac{1}{V_m C} \quad \text{équations 6 et 7}$$

d'où
$$V_m = \frac{1}{s+I} \quad \text{équation 8}$$

La surface spécifique totale de l'échantillon est alors donnée par la relation suivante

$$St = Nm\sigma = \frac{V_m N \sigma}{V_m} \times 10^{-20} \quad \text{équation 9}$$

où Nm est le nombre de molécules présentes dans la monocouche

σ est la surface occupée par une molécule d'adsorbat (en angstrom^2)

N est le nombre d'Avogadro ($N = 6,02 \cdot 10^{23} \text{ molécules} \cdot \text{mol}^{-1}$)

V_m est le volume molaire dans les conditions normales de température et de pression.

Détermination de la porosité par la méthode DFT

Les méthodes d'analyse utilisées habituellement pour l'analyse de la porosité sont basées sur une approche thermodynamique et macroscopique des phénomènes d'adsorption et de remplissage des pores. Le comportement des molécules adsorbées est considéré identique à celui de molécules en phase gazeuse. Les méthodes utilisant l'équation de Kelvin (équation 10), la méthode BJH par exemple, considèrent le phénomène de condensation dans les pores. Ces méthodes, bien que permettant une bonne approximation de la porosité de matériaux mésoporeux, sont complètement inadaptées à l'étude des micropores. A l'inverse,, d'autres méthodes ont été développées pour l'étude des micropores, mais ne sont pas applicables à des matériaux présentant des mésopores. La détermination de la porosité d'un matériau présentant des micro et mésopores implique l'utilisation

de deux méthodes différentes pour déterminer la distribution des tailles de pores à partir de l'isotherme d'adsorption.

$$\ln \frac{p}{p_0} = -\frac{fgVL}{rKT} \quad \text{équation 10}$$

où f est un facteur qui dépend de la forme du ménisque et donc indirectement de la forme des pores

g est la tension superficielle de l'adsorbat liquide

V_L est le volume molaire du liquide

R est le rayon de Kelvin défini par $\frac{1}{r} = \frac{1}{r_1} + \frac{1}{r_2} + \frac{1}{r_3}$

La méthode DFT permet de déterminer le profil de densité à l'équilibre en minimisant le potentiel d'énergie libre et cela quelque soit la position de la molécule sur la surface ou dans le pore. A partir de ce profil il est possible de donner une structure précise à un fluide confiné dans un pore. Sa densité décroît lorsque la distance des molécules avec les parois des pores augmente. Des isothermes associées à une taille de pore unique sont calculées en utilisant le profil de densité. Un ensemble d'isothermes est donc obtenu pour chaque système adsorbat/adsorbant donné. L'isotherme globale est reconstruite à partir de la somme des isothermes individuelles multipliées par leur distribution relative sur une gamme de taille de pores donnée.

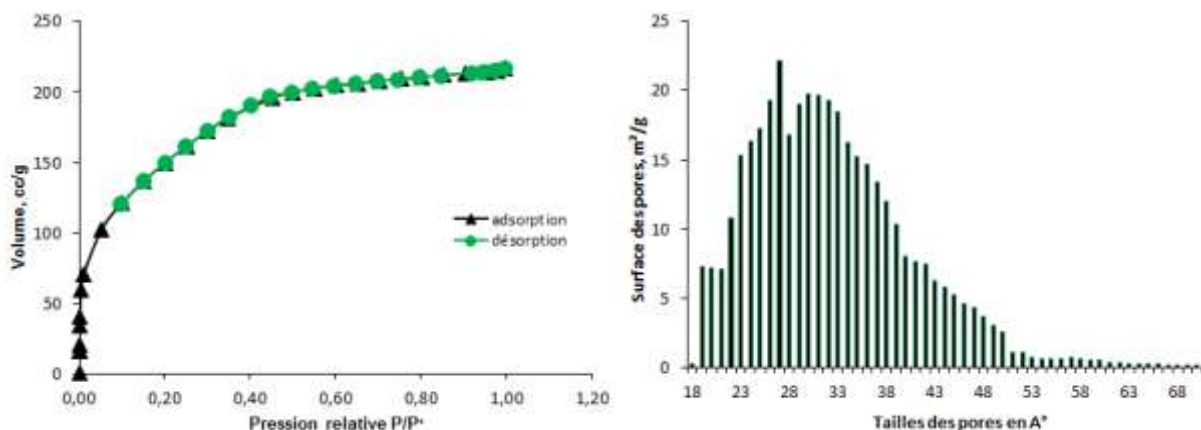


Figure 142. Isotherme d'adsorption-désorption et répartition des tailles de pores en surface pour une matrice TMOS/APTES 80/20.

II.4 Principe de la détermination de l'hydrophilie d'une surface par mesure de l'angle de contact d'une goutte sur la surface d'un matériau

La surface d'une goutte d'eau déposée sur une surface lisse, propre et plane, va prendre une forme sphérique dont la forme reflète les interactions ayant lieu à l'interface entre le liquide et la surface solide. La zone de contact entre le liquide et le solide est alors délimitée par une ligne de contact, aussi appelée ligne de tension. Cette ligne de tension repousse l'interface entre la phase liquide et la phase gazeuse de l'eau au niveau de l'interface liquide solide. La surface de la goutte va alors former un angle θ avec la surface du matériau. Cet angle θ définit l'angle de contact de la goutte avec le matériau. La figure suivante schématise le contact de la goutte d'eau avec le matériau.

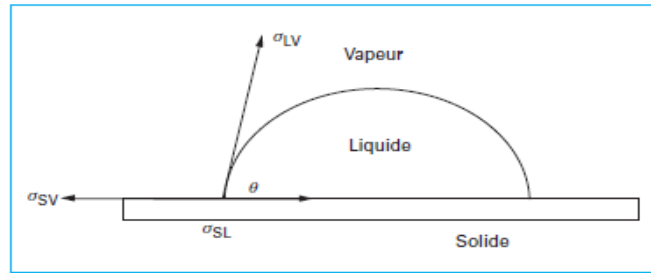


Figure 143. Interaction entre une goutte et la surface sur laquelle elle est déposée. (Les techniques de l'ingénieur)

Un bilan des forces appliquées à la goutte permet de se rendre compte que la forme de la goutte est dépendante de 3 paramètres : la tension interfaciale solide-liquide (γ_{SL}), la tension interfaciale solide vapeur (γ_{SV}) et la tension interfaciale liquide vapeur (γ_{LV}). Ces trois paramètres sont liés par l'équation de Young :

$$\gamma_{LV} \cos \theta + \gamma_{SL} - \gamma_{SV} = 0 \quad \text{équation 11}$$

qui permet ensuite de remonter à la valeur de l'angle θ .

$$\cos \theta = \frac{\gamma_{SV} - \gamma_{SL}}{\gamma_{LV}} \quad \text{équation 12}$$

Les valeurs prises par θ varient théoriquement entre deux valeurs extrêmes :

- dans le cas $\theta = 0^\circ$, le liquide s'étale parfaitement sur la surface considérée. Il y a mouillage totale de la surface. Dans ces conditions, la surface du matériau a une forte affinité pour l'eau, elle est hydrophile.
- dans le cas $\theta = 180^\circ$, le liquide ne mouille pas le support. La surface de contact entre le liquide et le matériau est minimale et se résume à un point. La surface n'a aucune affinité pour l'eau, elle est totalement hydrophobe. Cette situation n'est jamais rencontrée.

En pratique, la surface d'une goutte d'eau déposée sur une surface hydrophobe formera avec la surface du matériau un angle supérieur à 90° . A l'inverse, la surface d'une goutte d'eau déposée sur une surface hydrophile formera un angle inférieur à 90° avec cette surface.

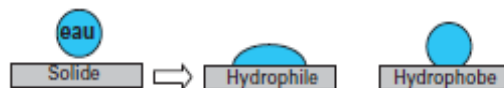


Figure 144. Les différents comportements d'une goutte d'eau déposée en surface d'un matériau : étalement dans le cas d'une surface hydrophile, rétraction dans le cas d'une surface hydrophobe (Les techniques de l'ingénieur).

Les mesures d'angle de contact ont été effectuées au moyen d'un système OCA 20 de la société Data physics.

Des mesures d'angle de contact ont été effectuées sur des monolithes de rapport molaire TMOS/APTES 97/3, 80/20 et sur des matrices TMOS/eau de rapport molaire 1/4, dopées de BBT. En

raison du gradient de concentration de BBT existant dans les monolithes dopés, une mesure a été effectuée dans la zone la plus clair et la plus foncée de la matrice.

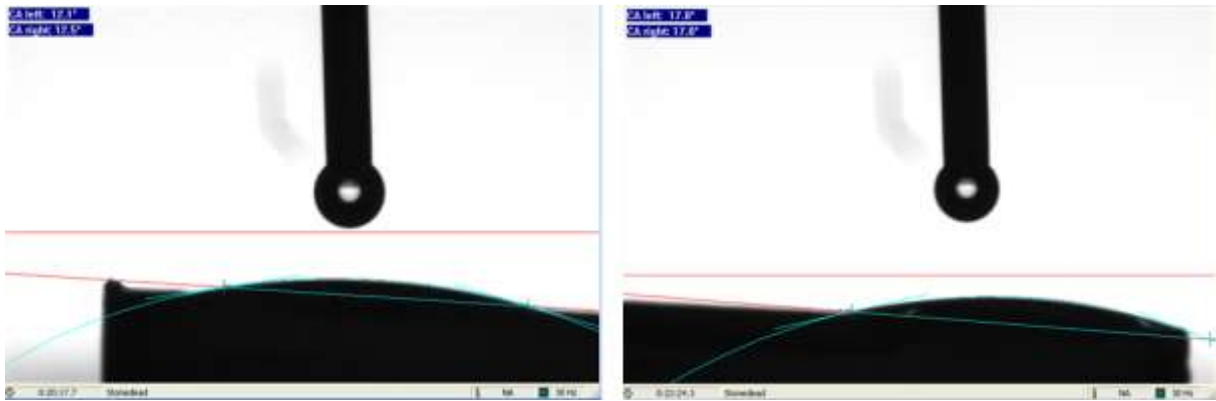


Figure 145. Cliché de mesure d'angle de contact sur monolithe dopé de BBT (TMOS/APTES 80/20).

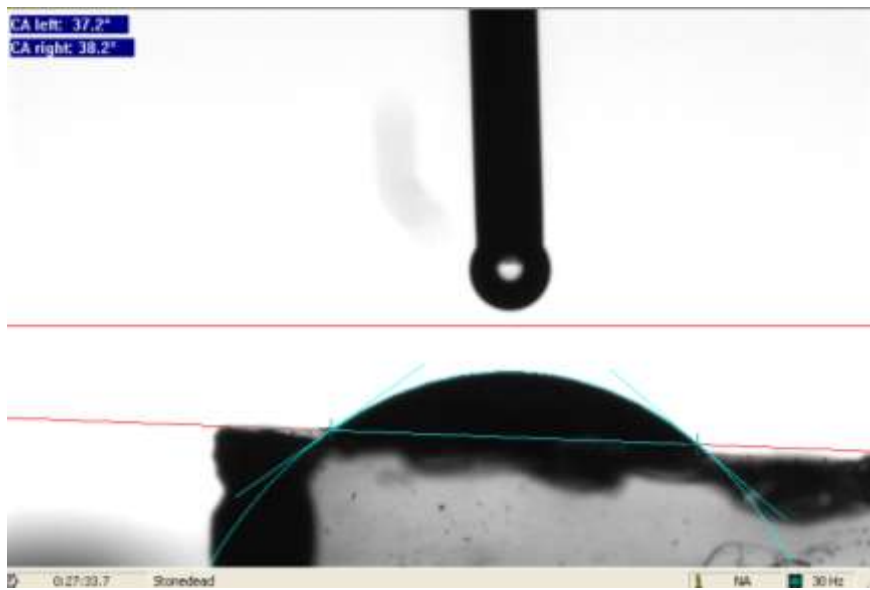


Figure 146. Cliché de mesure d'angle de contact sur monolithe dopé de BBT (TMOS/APTES 97/3)

ANNEXE DU CHAPITRE IV

I. Exposition de matrices dopées de $Tb(NO_3)_3$ et exposition à des flux gazeux calibrés d'acide nicotinique.

Principe de la mesure de l'épaisseur des films par profilométrie

La profilométrie est une méthode d'étude de l'état de surface des matériaux. Un stylet placé à l'extrémité d'un levier est positionné au contact d'une surface à analyser. Le déplacement horizontal du stylet à la surface du matériau va permettre de tracer le profil de la surface : le déplacement vertical du stylet en fonction de la topographie de la surface va être enregistré, ce qui va permettre de tracer le profil de cette surface.

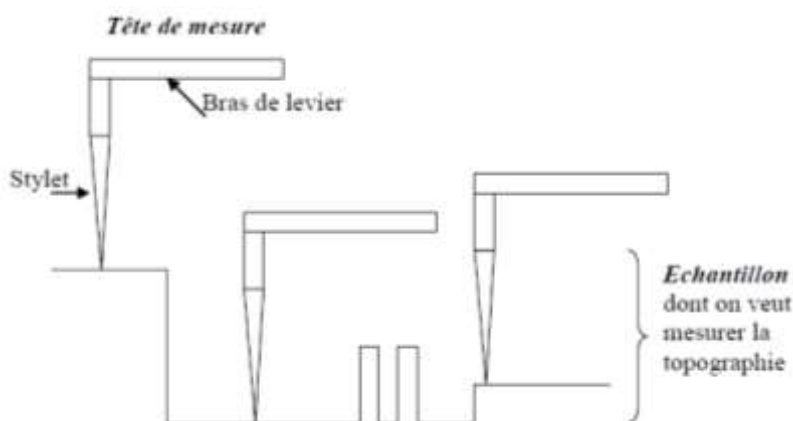


Figure 147. Schéma de fonctionnement d'une mesure profilométrique.

Les films obtenus par répartition centrifuge de sol sur lame de quartz recouvre la quasi-totalité du substrat. La mesure de l'épaisseur du dépôt nécessite de tracer un sillon sur la surface du dépôt. Ce sillon doit être suffisamment profond pour atteindre la surface du substrat et ainsi permettre la mesure de l'épaisseur du dépôt. L'établissement du profil de nos dépôts de couches minces et la mesure de leur épaisseur ont été effectués grâce à un profilomètre alphastep D120 de la société KLA Tencor. Les paramètres de la mesure sont présentés dans le tableau suivant.

Tableau 51. Paramètres de mesure profilométrique.

Paramètre	Longueur de mesure, mm	Vitesse de balayage, $mm.min^{-1}$	Force du stylet, mg	Gamme de mesure, μm
Valeur	6	2	5	2,5

I.1 Matériel de génération par perméation de gaz

Le tube à perméation

Le tube à perméation est fourni par la société VICI metronics. (N° série : 498-NIC1, part number : 137-100-9999-S56-C100). Le tube a une longueur de 10 cm. La membrane perméable permet d'obtenir un taux de perméation de $1848 \text{ ng}\cdot\text{min}^{-1}$ à une température de chauffage de 100°C .



Figure 148. Le tube à perméation d'acide nicotinique.

Four à perméation

Le four à perméation est un perméamètre de laboratoire PUL010 de la société Fives-Pillard. Le four est muni d'une chambre de perméation de 13 cm de long et 5 cm de diamètre interne dans laquelle est introduit le tube et où le mélange du perméat avec le gaz vecteur a lieu. Le four opère à une température de 100°C . La pression d'entrée d'azote était de 3 bars, le four était balayé par un flux d'azote de $80 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.



Figure 149. Vues externe et interne du four à perméation.

Rampe de dilution

La rampe de dilution était constituée de 4 régulateurs de débit massique Bronkhorst de débit maximal 10, 200, 300 et $1000 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Elle permettait d'effectuer une double dilution du gaz provenant du perméamètre. Le premier étage de dilution permet de diluer l'échantillon de 10 à 100 fois et le deuxième d'un facteur 200 supplémentaire. La tuyauterie de la rampe est en acier

inoxydable. Des rubans chauffants étaient enroulés autour des tuyaux pour limiter la recondensation des vapeurs d'acide nicotinique.



Figure 150. Vue de la rampe de dilution.

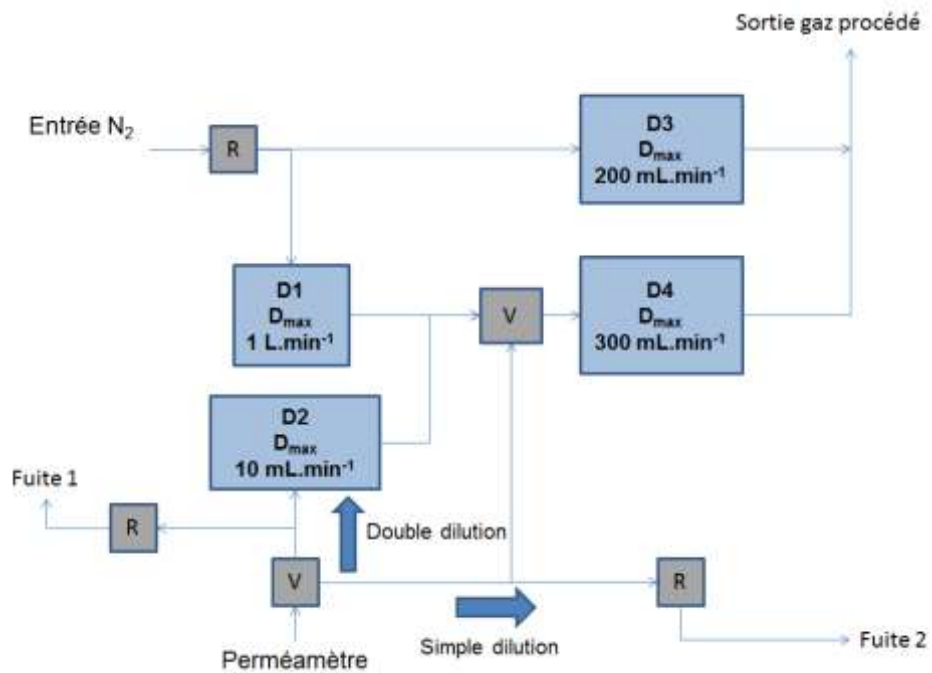


Figure 151. Schéma du dispositif de dilution du gaz en provenance du perméamètre.

R = Robinet, V = vanne 3 voies

Résumé

La tuberculose tue environ 2 millions de personnes chaque année, principalement à cause d'un diagnostic tardif ou inefficace ou de soins trop tardifs. Les techniques de diagnostic les plus efficaces sont souvent coûteuses et complexes à mettre en œuvre dans les pays en voie de développement, régions de plus forte incidence de la maladie. L'objectif de ce projet est l'élaboration de capteurs luminescents à base de matériaux nanoporeux élaborés par procédé Sol-Gel pour détecter un métabolite très spécifique de *Mycobacterium tuberculosis*, l'acide nicotinique (AN), présent dans l'haleine des malades à des concentrations de quelques dizaines à quelques centaines de ppq, et de le discriminer vis-à-vis d'autres métabolites.

Un complexe de nitrate de terbium (III) a été choisi comme molécule-sonde car la luminescence du terbium (III) peut être exaltée en présence de certains ligands organiques, notamment l'acide nicotinique. Une première étape a consisté à déterminer en solution les conditions de pH les plus favorables à la formation de complexes luminescent Tb(III)/AN. Ainsi l'établissement d'un pH de 6,4 dans un milieu tampon à base d'hexamine permet d'optimiser la formation du complexe Tb(III)/AN et le transfert d'énergie du ligand vers le cation. Le dosage de l'acide nicotinique est possible dans ces conditions dans une gamme de concentration de 400 nmol.L⁻¹ à 100 μmol.L⁻¹, soit de 7,2 ppb à 1,8 ppm.

La seconde étape a consisté à produire des matrices nanoporeuses à base d'alcoxydes de silicium en vue d'obtenir des matrices à pH intrapore similaire ou proche de 6,4. Les variations de pH intrapore des matrices lors du piégeage de vapeur d'eau et/ou de dioxyde de carbone, deux interférents présents à des concentrations élevées dans l'haleine, ont été étudiées au moyen d'un colorant sensible au pH, le bleu de bromothymol. Les matrices ont été élaborées à partir de deux précurseurs de silice, dont un possédant une chaîne aminopropyle lui conférant un caractère basique. L'exposition des matrices à de la vapeur d'eau jusqu'à saturation a montré que le pH intrapore des matrices contenant 3% du précurseur aminé varie entre 6,5 et 6, gamme de pH optimisée pour la formation du complexe Tb(III)/AN.

Dans la dernière étape, des matrices à 3% de précurseur aminé, dopés de terbium et tamponnées à pH 6,4 avec de l'hexamine ont été élaborées. Des mesures de luminescence de matrices exposées de manière statique à des vapeurs d'acide nicotinique pur ou provenant d'une solution aqueuse saturée ont montré une augmentation de la luminescence des matrices, preuve d'un piégeage effectif de l'acide nicotinique et de la formation in situ de complexes luminescents Tb(III)/AN. Malgré la présence d'eau qui désactive partiellement l'état excité de Tb³⁺, le piégeage de l'acide nicotinique et la formation de complexes Tb(III)/NA dans ces matrices demeure efficace. Les études d'interférence ont permis de montrer que la présence de marqueurs secondaires, comme le nicotinate de méthyle, affecte la luminescence des complexes Tb(III)/AN uniquement par absorption compétitive du rayonnement d'excitation. Des solutions permettant de s'affranchir des interférences des métabolites secondaires sont à l'étude.

Abstract

Tuberculosis kills about 2 million people each year, due mainly either to late or ineffective diagnoses or to late care. The most efficient diagnostic methods are often expensive and too complex to be implemented in developing countries, which are the regions of highest incidence of the disease. The objective of this project is the development of luminescent sensors based on nanoporous materials prepared by sol-gel method for the detection of nicotinic acid (NA), a very specific metabolite of *Mycobacterium tuberculosis*. This metabolite, which is present in the breath of patients at very low concentrations from few tens to few hundreds of ppq, must be discriminated from other metabolites.

A terbium nitrate (III) complex was selected as probe molecule since the luminescence of terbium (III) can be greatly increased when the cation is coordinated with organic ligands such as nicotinic acid. A first step was to determine in solution the most favorable environment for the formation of Tb (III)/AN complexes, to be later reproduced in a more complex environment of a nanoporous sensor. A buffer solution of hexamine at pH = 6.4 was found to optimize both the coordination of NA to Tb (III) and the energy transfer from the excited ligand to the cation. The quantitative measurement of nicotinic acid is possible under these conditions in a concentration range of 400 nmol.L⁻¹ - 100 μmol.L⁻¹, or 7.2 ppb - 1.8 ppm.

To be able to produce nanoporous sensors doped with Tb(III) to detect gaseous NA, a second step was first to produce nanoporous matrices with hybrid silicon alkoxides precursors with an intrapore pH of 6.4, as previously optimized in solution. This is achieved by adding to tetramethoxysilane various proportions of a silicon precursor bearing a functional amino group; the pH change in the matrix pores can be measured by using as pH probe the pH-sensitive dye, bromothymol blue. The matrices were doped with the dye and exposed to gas mixtures containing water vapor or/and CO₂, two interfering compounds present at high concentrations in the breath. The silicon matrix containing 3% of the amine precursor, whose intrapore pH varies between 6.5 and 6 during its exposure to water vapor up to saturation, was selected to host the Tb(III) complexes.

In the last step, monolithic and thin films of the hybrid material containing 3% of amino group were doped with terbium nitrate and hexamine. With luminescence measurements of these matrices exposed in static mode to pure NA vapor or to aqueous solution saturated with NA, it was shown that NA molecules are trapped in the nanopores and form with Tb(III) very luminescent Tb(III)/AN complexes. Despite the presence of water which partially deactivates the excited state of Tb³⁺, the trapping of nicotinic acid and formation of Tb(III)/NA complex in these matrices remains effective. The Interference studies have shown that the presence of secondary metabolites, such as methyl nicotinate, affects the luminescence of Tb(III)/AN complexes, but only via a competitive absorption of the excitation radiation. Novel strategies to overcome interferences of secondary metabolites are under study.