



HAL
open science

**Intérêt des polymères à empreintes moléculaires pour la
préparation d'échantillons par extraction solide-liquide.
Applications aux triterpènes dans les plantes et aux
dopants dans les urines.**

Béregère Claude

► **To cite this version:**

Béregère Claude. Intérêt des polymères à empreintes moléculaires pour la préparation d'échantillons par extraction solide-liquide. Applications aux triterpènes dans les plantes et aux dopants dans les urines.. Autre. Université d'Orléans, 2007. Français. NNT: . tel-00148669

HAL Id: tel-00148669

<https://theses.hal.science/tel-00148669>

Submitted on 23 May 2007

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.



UNIVERSITE D'ORLEANS

THESE

PRESENTEE

A L'UNIVERSITE D'ORLEANS

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE D'ORLEANS

Discipline : Chimie Analytique

PAR

Bérengère CLAUDE

Intérêt des polymères à empreintes moléculaires pour la préparation
d'échantillons par extraction solide-liquide.

Applications aux triterpènes dans les plantes et aux dopants dans les urines.

Dirigée par le Pr. Philippe MORIN et le Pr. Michel LAFOSSE

Soutenue publiquement le 27 Mars 2007

MEMBRES DU JURY

M. Paul-Louis DESBENE	Rapporteur	Professeur à l'IUT d'Evreux
Mme Valérie PICHON	Rapporteur	Maître de Conférence à l'ESPCI – Paris
M. Karsten HAUPT	Président	Professeur à l'UTC de Compiègne
M. Jacques de CEARRIZ	Examineur	Directeur de l'aflid – Châtenay-Malabry
M. Patrice ANDRE	Examineur	Directeur du Département Innovation Actifs, LVMH Recherche – Saint Jean de Braye
M. Philippe MORIN	Examineur	Professeur à l'IUT d'Orléans
M. Michel LAFOSSE	Examineur	Professeur à l'Université d'Orléans

THESE

PRESENTEE

A L'UNIVERSITE D'ORLEANS

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE D'ORLEANS

Discipline : Chimie Analytique

PAR

Bérengère CLAUDE

Intérêt des polymères à empreintes moléculaires pour la préparation
d'échantillons par extraction solide-liquide.

Applications aux triterpènes dans les plantes et aux dopants dans les urines.

Dirigée par le Pr. Philippe MORIN et le Pr. Michel LAFOSSE

Soutenue publiquement le 27 Mars 2007

MEMBRES DU JURY

M. Paul-Louis DESBENE	Rapporteur	Professeur à l'IUT d'Evreux
Mme Valérie PICHON	Rapporteur	Maître de Conférence à l'ESPCI – Paris
M. Karsten HAUPT	Président	Professeur à l'UTC de Compiègne
M. Jacques de CEARRIZ	Examineur	Directeur de l'aflid – Châtenay-Malabry
M. Patrice ANDRE	Examineur	Directeur du Département Innovation Actifs, LVMH Recherche – Saint Jean de Braye
M. Philippe MORIN	Examineur	Professeur à l'IUT d'Orléans
M. Michel LAFOSSE	Examineur	Professeur à l'Université d'Orléans

Ce travail de thèse a été réalisé à l'Institut de Chimie Organique et Analytique (ICOA) à Orléans, au sein de l'équipe de chimie analytique dirigée par le professeur Michel Lafosse. Je remercie le professeur Lafosse pour sa disponibilité, son écoute et ses précieux conseils scientifiques. Je remercie aussi le professeur Michel Dreux, précédent responsable de l'équipe analytique ainsi que les professeurs Gérard Guillaumet et Olivier Martin, ancien et actuel directeurs de l'ICOA, pour leur accueil au sein de l'Institut.

J'adresse ma profonde gratitude au professeur Philippe Morin pour m'avoir encadrée avec rigueur tout au long de ce travail de thèse. Je le remercie très sincèrement pour le soutien scientifique et humain qu'il m'a apporté depuis mon arrivée dans l'équipe d'enseignants de l'IUT de Chimie d'Orléans, en septembre 2000, jusqu'à l'aboutissement de ce travail de thèse.

Je remercie madame Valérie Pichon, maître de conférences au Laboratoire Environnement et Chimie Analytique (LECA) de l'Ecole Supérieure de Physique et Chimie Industrielles de Paris et monsieur le professeur Paul-Louis Desbène, responsable du Laboratoire d'Analyse des Systèmes Organiques Complexes (LASOC) de l'Université de Rouen de m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce travail et d'en être les rapporteurs.

Je remercie aussi très sincèrement le professeur Karsten Haupt de l'Université de Technologie de Compiègne (UTC), d'avoir accepté de participer à ce jury et de m'avoir initiée, en collaboration avec Anne-Sophie Belmont, à la synthèse et à l'application des MIPs. Sont associés à ces remerciements les membres de la société PolyIntell pour leur confiance et les échanges toujours très enrichissants que nous avons eus au sujet de l'application des MIPs aux matrices complexes.

Je remercie également monsieur Patrice André (LVMH) et le professeur Jacques de Ceauriz (agence française de lutte contre le dopage, afld) d'avoir accepté de participer à ce jury et de m'avoir accueillie dans leurs laboratoires respectifs. Je remercie leurs collaborateurs, Cécile Lamy, Sylvie Darnault et Laurent Pascaud pour l'aide qu'ils m'ont apportée.

Parmi ces remerciements, j'ai une pensée particulière pour mes collègues de l'équipe enseignante de l'IUT, Patrick Chaimbault, Raphaël Delépée, Martine Beaufour, Loïc Burnell, Jean-Pierre Gaudin, Henri Fauduet et son équipe, Jean-Yves Mérour, Valérie Béneteau,

Remerciements

Pascal Bouyssou, Sylvain Routier, Patrice Carmona, Marina Licheron, André Astruc, Josiane Bouron, Corinne Chevrier... pour leur aide, leurs conseils scientifiques et les encouragements qu'ils m'ont prodigués au cours de ces dernières années.

Je remercie aussi très sincèrement les enseignants de l'UFR Sciences, Patrick Favetta, Christelle Dufresnes, Caroline West, Emilie Destandau pour leur présence et leur écoute.

Enfin, je remercie tous mes collègues et amis de l'ICOA, Marine de Person, Romain Jacquet, Marie Lorin, Bérangère Merelli, Sandrine Zubrzicky, Karim Keddadouche, Ralucca, Boutayna, Pascale Denis, Damien Jegourel, Vincent Bézy, Hélène Dessans, Marie-Elisabeth Lucchesi, Jean-Marie Robert, Priscilla David, Damien Jegourel, Flavien Denis... Chacun d'eux m'a accompagnée et aidée au cours de mes travaux, avec beaucoup de gentillesse, de patience et de dévouement.

Mes pensées reviennent tout particulièrement à mes parents et à ma sœur que je remercie pour leur aide et leur soutien, sans lesquels ce travail n'aurait pu aboutir. J'y associe tous les amis, fidèles et soucieux de m'accompagner au cours de ces dernières années.

SOMMAIRE

SOMMAIRE

<u>INTRODUCTION GENERALE</u>	10
Définitions.....	13
Abréviations.....	14

Chapitre I: Etude bibliographique des polymères à empreintes moléculaires utilisés lors de la préparation d'échantillon par extraction solide-liquide
--

<u>I.1. RAPPEL HISTORIQUE SUR L'ADSORPTION SELECTIVE PAR IMPRESSION MOLECULAIRE – DEMARCHE DE L'IMPRESSION MOLECULAIRE</u>	16
<u>I.2. DIFFERENTES APPROCHES</u>	18
<i>a) Approche covalente</i>	18
<i>b) Approche non covalente</i>	19
<i>b-1) Monomère fonctionnel</i>	19
<i>b-2) Stoechiométrie du mélange de prépolymérisation</i>	23
<i>c) Approche semi-covalente</i>	24
<i>d) Conclusion</i>	26
<u>I.3. VOIES DE SYNTHÈSE DES POLYMERES A EMPREINTES MOLECULAIRES</u>	26
<i>a) Format des polymères</i>	26
<i>a-1) Particules de formes irrégulières</i>	26
<i>a-2) Billes de taille homogène</i>	27
<i>b) Réactifs de polymérisation</i>	29
<i>b-1) Molécule empreinte</i>	29
<i>b-2) Solvant porogène</i>	31
<i>b-3) Agent réticulant</i>	31
<i>b-4) Initiateur de polymérisation</i>	34
<i>c) Caractérisation du MIP</i>	35
<i>c-1) Mise en évidence de la formation d'empreintes</i>	35
<i>c-2) Evaluation du nombre et de l'affinité des empreintes</i>	38
<i>c-3) Porosité, surface spécifique</i>	40

I.4. APPLICATION DES MIPs A L'EXTRACTION SOLIDE-LIQUIDE	41
<i>a) Principe de l'extraction solide-liquide et limites des phases commerciales pour une extraction sélective</i>	41
<i>a-1) Principe de l'extraction solide-liquide (SPE)</i>	41
<i>a-2) Sélectivité d'extraction des phases stationnaires commerciales</i>	45
<i>b) Préparation d'échantillon sur un polymère à empreintes moléculaires</i>	47
<i>b-1) Mise en place d'un protocole SPE-MIP sélectif</i>	48
<i>b-2) Capacité du MIP</i>	52
I.5. CONCLUSION	54
Références bibliographiques	55

Chapitre II: Application des MIPs au clean-up d'un échantillon organique : cas des extraits de plantes

II.1) ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE DE L'ANALYSE DES TRITERPENES	60
II.1.1. Rôle des triterpènes dans les plantes	60
II.1.2. Méthodes d'analyse des triterpènes	62
<i>a) Chromatographie sur couche mince</i>	63
<i>b) Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse</i>	63
<i>b-1) Etude bibliographique de l'analyse des triterpènes pentacycliques par CPG-SM</i> ...63	
<i>b-2) Analyse d'un extrait d'écorces de platane par CPG-SM</i>	66
<i>c) Chromatographie en phase liquide</i>	72
<i>c-1) CPL-UV et CPL-DEDL</i>	73
<i>c-2) CPL-SM</i>	76
<i>d) Electrophorèse capillaire</i>	78
II.1.3. Préparation d'un extrait de plantes	79
<i>a) Fractionnement de familles de composés à partir de la plante séchée –</i> <i>Obtention d'un extrait de plantes</i>	79
<i>b) Extraction solide-liquide (SPE)</i>	80
<i>b-1) Sur silice greffée C₁₈</i>	81
<i>b-2) Sur support échangeur anionique (faible et fort)</i>	83

II.1.4. <u>Conclusion</u>	84
II.2) <u>PREPARATION ET EVALUATION DU POLYMERE A EMPREINTES MOLECULAIRES DE L'ACIDE 18-β-GLYCYRRHETINIQUE</u>	86
II.2.1. <u>Choix des polymères à empreintes moléculaires pour l'extraction sélective de l'acide 18-β-glycyrrhétinique, molécule active contenue dans un extrait de plantes</u>	86
II.2.2. <u>Evaluation du MIP – Ac-β-Gly</u>	88
<i>a) Mise en évidence de la formation des empreintes</i>	88
<i>a-1) Conditions expérimentales</i>	88
<i>a-2) Isothermes d'adsorption de l'Ac-β-Gly</i>	89
<i>b) Etude de la capacité du polymère à empreintes moléculaires</i>	90
<i>b-1) Conditions expérimentales</i>	90
<i>b-2) Courbe de capacité des cartouches SPE</i>	91
<i>c) Réactivité croisée du polymère à empreintes moléculaires vis-à-vis de molécules appartenant à la famille des triterpènes</i>	92
II.2.3. <u>Application à l'analyse d'un extrait hydrolysé de racines de réglisse</u>	95
<i>a) Mise au point du protocole SPE</i>	95
<i>b) Evaluation de la capacité du MIP pour la préparation d'un extrait hydrolysé de racines de réglisse</i>	96
II.2.4. <u>Conclusion</u>	97
II.3) <u>PREPARATION ET EVALUATION D'UN POLYMERE A EMPREINTES MOLECULAIRES D'UN ALCOOL TRITERPENIQUE (Bétuline)</u>	99
II.3.1. <u>Choix des polymères à empreintes moléculaires pour l'extraction sélective de la bétuline et de ses dérivés lupanes</u>	99
II.3.2. <u>Etude de la réactivité croisée du MIP-bétuline vis-à-vis d'autres composés triterpéniques lupanes</u>	102
<i>a) Mise en place d'un protocole SPE sur le MIP-bétuline</i>	102
<i>b) Choix du chloroforme (solvant porogène) pour les étapes de dépôt et de lavage</i>	102
<i>c) Etude de la réactivité croisée du MIP avec l'acétonitrile comme solvant de dépôt et de lavage</i>	105
II.3.3. <u>Conclusion</u>	107

II.4) <u>CONCLUSION MIPs TRITERPENES</u>	108
--	-----

Références bibliographiques.....	109
----------------------------------	-----

Chapitre III : Application des polymères à empreintes moléculaires au clean-up d'un échantillon aqueux : cas d'un dopant dans les urines

III.1) <u>ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE DE L'ANALYSE DE MOLECULES ET DE LEURS METABOLITES DANS LES URINES</u>	113
---	-----

III.1.1. <u>Présentation générale du dopage sportif</u>	113
---	-----

a) <i>Principales familles de molécules dopantes</i>	113
--	-----

b) <i>Cas particulier des anti-oestrogènes (tamoxifène et clomiphène)</i>	117
---	-----

III.1.2. <u>Méthodes d'analyse du tamoxifène dans les fluides biologiques</u>	119
---	-----

a) <i>Chromatographie en phase liquide</i>	119
--	-----

a-1. <i>Détecteurs non informatifs</i>	119
--	-----

a-2. <i>Détecteur informatif</i>	123
--	-----

b) <i>Chromatographie en phase gazeuse</i>	123
--	-----

c) <i>Electrophorèse capillaire</i>	129
---	-----

III.1.3. <u>Méthodes de préparation d'échantillons</u>	131
--	-----

a) <i>Extraction liquide – liquide (LLE)</i>	131
--	-----

b) <i>Extraction solide – liquide (SPE)</i>	132
---	-----

III.2) <u>ETUDE DU SUPPORT A RECONNAISSANCE MOLECULAIRE DU TAMOXIFENE</u>	135
---	-----

III.2.1. <u>Synthèse</u>	135
--------------------------------	-----

III.2.2. <u>Mise en évidence des empreintes</u>	136
---	-----

a) <i>Conditions expérimentales</i>	136
---	-----

b) <i>Isothermes d'adsorption (concentration en tamoxifène constante et masse de polymère variable)</i>	137
---	-----

c) <i>Isothermes de Freundlich et distribution d'affinité (concentration en tamoxifène variable et masse de polymère constante)</i>	138
---	-----

c-1) <i>Constante d'association K_{ass}</i>	139
--	-----

c-2) <i>Isotherme de Freundlich</i>	139
---	-----

c-3) <i>Distribution d'affinité</i>	140
---	-----

c-4) Application des isothermes de Freundlich au MIP du tamoxifène.....	142
d) Conclusion.....	145
III.2.3. Morphologie.....	146
a) Détermination de la surface spécifique et du volume poreux.....	146
b) Détermination de la taille des particules et de leur morphologie par MEB.....	147
<u>III.3) ÉVALUATION DU SUPPORT A RECONNAISSANCE MOLECULAIRE LORS DE L'EXTRACTION SOLIDE-LIQUIDE DU TAMOXIFENE</u>	149
III.3.1. <u>Etude de la recapture du tamoxifène et de son principal métabolite</u>.....	149
a) Protocole expérimental.....	149
b) Paramètre régulant les liaisons hydrogène.....	150
c) Paramètre régulant les interactions hydrophobes.....	152
d) Paramètre régulant les interactions ioniques.....	154
e) Conclusion.....	156
III.3.2. <u>Etude d'un MIP à un seul monomère fonctionnel MAA (MIP A)</u>.....	157
III.3.2.1. Réalisation d'une SPE seule sur MIP A.....	157
a) Cas d'une solution standard de tamoxifène.....	157
b) Cas d'une urine dopée au tamoxifène.....	160
c) Cas d'une urine hydrolysée, dopée au tamoxifène et au 4-hydroxytamoxifène	163
d) Conclusion.....	166
III.3.2.2. Réalisation de deux SPE successives sur HLB et MIP A.....	167
a) Protocole d'une SPE combinée HLB-MIP.....	167
b) Commentaires.....	171
III.3.3. <u>Etude d'un MIP mixte à deux monomères fonctionnels MAA-styrène (MIP B)</u>.....	173
III.3.3.1. Identification des conditions expérimentales d'utilisation du MIP styrène-MAA (MIP B).....	174
III.3.3.2. Réalisation d'une SPE seule sur MIP B.....	177
III.3.3.3. Réalisation de deux SPE successives sur HLB et MIP B.....	179
III.3.4. <u>Conclusion</u>.....	183

Références bibliographiques.....	187
<u>CONCLUSION GENERALE.....</u>	191
Annexe I : Caractérisation des solvants.....	195
Annexe II : Répartition des métabolites secondaires dans les plantes.....	197
Annexe III : Méthode d'analyse par chromatographie sur couche mince (CCM) appliquée lors du screening phytochimique des extraits de plantes.....	198
Annexe IV : Protocoles de synthèse des MIPs.....	199
Annexe V : Conditions chromatographiques d'analyse de l'Ac-β-Gly et de la bétuline.....	204
Annexe VI : Protocole de préparation d'un extrait hydrolysé de racines de réglisse.....	205
Annexe VII : Rappel sur la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.....	206
Annexe VIII : Préparation d'un extrait méthanolique d'écorces de platane.....	209
Annexe IX : Métabolites du tamoxifène.....	211
Annexe X : Analogues du tamoxifène.....	215
Annexe XI : Conditions chromatographiques d'analyse du tamoxifène et de ses métabolites.....	216
Annexe XII : Evaluation du volume moléculaire par modélisation.....	219
Annexe XIII : Composition moyenne d'une matrice urinaire.....	220
Annexe XIV : Composition chimique des tampons utilisés.....	224
Annexe XV : Hydrolyse des métabolites du tamoxifène par l'enzyme β-glucuronidase.....	225
Annexe XVI : Caractéristiques de la cartouche Waters HLB.....	227
Annexe XVII: Conditions d'analyse du tamoxifène et du 4-hydroxytamoxifène par CPL-SM/SM.....	228
Annexe XVIII: SPE-MIP A (PROTOCOLE 1) appliquée au tamoxifène et 4-hydroxytamoxifène (0,5 μg/mL) dissous dans le tampon PBS.....	232
Annexe XIX : Communications écrites et orales.....	233

INTRODUCTION GENERALE

L'analyse de mélanges complexes tels que les fluides biologiques, les extraits de plantes, les eaux de rejets industriels, les produits agro-alimentaires, etc. constitue une préoccupation majeure des laboratoires de contrôle et de recherche, et nécessite des méthodes analytiques à la fois sensibles et spécifiques. Aujourd'hui, la spectrométrie de masse couplée à des méthodes séparatives performantes favorise le dosage de composés à l'état de traces. Cependant, ces outils mis à la disposition de l'analyste ne permettent pas systématiquement d'identifier et de quantifier les espèces recherchées lorsque ces dernières sont contenues dans des matrices chargées. Ainsi, la présence d'interférences peut masquer les pics ciblés à cause de coélutions et entraîner des suppressions ioniques en spectrométrie de masse. La préparation d'échantillon par extraction solide-liquide (SPE) tend à éliminer ces difficultés ; les supports classiques (supports silice greffée ou polymériques) à caractère hydrophobe ou échangeur ionique assurent des rendements d'extraction élevés. En revanche, leur sélectivité est parfois insuffisante pour des échantillons constitués de composés d'hydrophobie similaire et/ou de charge ionique identique à celles des composés recherchés.

Toutefois, les polymères à empreintes moléculaires (MIP, Molecular Imprinted Polymer) constituent des matériaux capables de répondre aux critères de sélectivité posés. Les MIPs peuvent reconnaître une molécule voire une famille de molécules analogues, de manière sélective, au sein d'un mélange complexe. Cette reconnaissance moléculaire des MIPs est fondée sur la présence de cavités développant une complémentarité spatiale et fonctionnelle de la molécule recherchée.

Depuis les années 1990, les travaux publiés montrent l'intérêt porté aux MIPs pour la préparation d'échantillon par extraction solide-liquide.

La synthèse d'un MIP se fait à partir de monomères et d'une molécule empreinte interagissant au cours de la polymérisation par des liaisons de différentes natures (covalentes ou non). Le matériau final, obtenu après l'élimination de la molécule empreinte, contient des cavités (sites ou empreintes) gardant mémoire de la molécule empreinte.

Le premier chapitre de ce manuscrit s'appuie sur des travaux publiés afin d'expliquer la démarche suivie au cours de la préparation d'un MIP. Le choix des réactifs et du protocole de synthèse sera justifié en fonction de la finalité du MIP. Des méthodes de caractérisation du matériau seront décrites. La dernière partie de ce chapitre portera sur les conditions d'application des MIPs à la SPE à travers différents exemples.

Les chapitres II et III traitent des résultats obtenus au laboratoire lors de l'application des MIPs à la préparation d'extraits de plantes et d'échantillons urinaires. Ces travaux tendent à mettre en évidence les mécanismes de rétention mis en jeu entre le MIP et les analytes contenus dans des matrices de natures différentes.

Le chapitre II a traité à l'extraction l'acide 18- β -glycyrrhétinique présent dans la racine de réglisse et à celle de dérivés de la bétuline contenus dans les écorces de platane. Les échantillons végétaux sont préparés dans des solvants organiques. Les composés recherchés appartiennent à la famille des triterpènes pentacycliques, molécules hydrophobes contenant quelques groupes fonctionnels. Dans chaque cas, un MIP spécifique de la molécule ciblée sera synthétisé.

L'acide 18- β -glycyrrhétinique devra être extrait d'une matrice organique polaire. Une étude de la capacité du MIP avec une solution standard et une matrice réelle (extrait de racine de réglisse) sera réalisée.

Les dérivés de la bétuline présents dans un extrait d'écorces de platane, seront identifiés par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse après une double SPE sur supports classiques (hydrophobe et échangeur ionique). Les performances de ces phases seront comparées à celles d'un MIP pour l'extraction sélective de la famille des triterpènes.

Le chapitre III reporte l'extraction du tamoxifène, anti-œstrogène non stéroïdien, et celle de ses métabolites contenus dans l'urine, matrice aqueuse saline. Les métabolites étant présents en faible concentration, une étape de préconcentration est nécessaire en préalable de toute analyse. Une procédure d'extraction solide-liquide sur un MIP, préparé de manière à reconnaître sélectivement le tamoxifène et ses analogues, sera développée.

L'effet compétiteur des sels de la matrice urinaire sera pris en compte pour la recapture spécifique des molécules ciblées par les empreintes du MIP.

D'autre part, l'influence du caractère hydrophobe du MIP sur la simplification du protocole et sur l'augmentation des rendements d'extraction sera étudiée.

Dans les deux chapitres expérimentaux, les échantillons récupérés après extraction sur MIP seront analysés par chromatographie en phase liquide couplée à un détecteur d'absorption UV. Cette méthode d'analyse, simple et rapide, permettra d'évaluer les rendements d'extraction et de vérifier l'élimination par le protocole SPE des pics interférents provenant de la matrice.

Définitions

- **Capacité** : quantité maximale d'un composé adsorbée par le MIP.

La capacité peut se mesurer par la quantité maximale de composé retenue spécifiquement par le MIP selon un protocole SPE établi.

La capacité peut aussi être assimilée au nombre de sites spécifiques présents dans le MIP, déterminé à partir d'équilibres d'adsorption suivis du tracé d'isothermes de Scatchard.

- **Clean-up** : le clean-up d'un échantillon consiste à éliminer la matrice d'un échantillon par un processus d'extraction solide-liquide. L'échantillon récupéré doit idéalement ne contenir que les molécules recherchées.

- **Interférents** : les interférents sont des espèces présentes dans l'échantillon analysé et capables de diminuer le rendement d'extraction des molécules recherchées et/ou d'entraîner des problèmes de co-élution chromatographique.

- **Molécule ciblée (ou d'intérêt)** : molécule recherchée dans un échantillon.

- **Molécule empreinte** (template en anglais) : molécule introduite dans le mélange de prépolymérisation pour la synthèse d'un polymère à empreintes moléculaires (MIP).

- **Réactivité croisée** : extraction simultanée de plusieurs composés d'une même famille structurale.

- **Recouvrement** (ou récupération) : pour chaque étape d'un protocole SPE, le recouvrement est défini comme le rapport de la quantité de molécule récupérée sur la quantité de molécule déposée initialement sur le support.

- **Recouvrement global** : somme des recouvrements obtenus aux différentes étapes d'un protocole SPE.

- **Rendement d'extraction** : le rendement d'extraction SPE d'une molécule est calculé à partir du rapport de la quantité de molécule récupérée à l'élution (ou quantité extraite) sur la quantité de molécule déposée (ou percolée).

- **Sélectivité** : la sélectivité d'un MIP évalue la proportion d'interactions spécifiques provenant des empreintes par rapport aux interactions non spécifiques issues de la matrice polymérique (évaluées à partir du NIP). La sélectivité dépend de l'affinité des empreintes vis-à-vis des molécules ciblées ainsi que du nombre de ces empreintes.

- **Spécificité** : la spécificité d'un MIP est l'aptitude de ce matériau à retenir sélectivement la molécule ciblée ou des molécules analogues dans un échantillon complexe.

Abréviations

ACN (CH₃CN)	Acétonitrile
AcOH	Acide acétique
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionisation - Ionisation chimique à pression atmosphérique
CCM (HPTLC)	Chromatographie sur couche mince
CPG (GC)	Chromatographie en phase gazeuse
CPL (HPLC)	Chromatographie en phase liquide
DEDL	Détecteur évaporatif à diffusion de la lumière
EDMA	Ethylène glycol diméthacrylate
ESI	Electrospray Ionisation - Ionisation par électrospray
EC	Electrophorèse capillaire
FID	Flame Ionisation Detector – Détecteur à ionisation de flamme
LLE	Liquid-Liquid Extraction - extraction liquide-liquide
LOD	Limit of Detection – Limite de détection
LOQ	Limit of Quantification – Limite de quantification
MAA	Acide méthacrylique
MEKC	Micellar Electrokinetic Chromatography - Electrophorèse micellaire
MeOH (CH₃OH)	Méthanol
MIP	Molecular Imprinted Polymer - polymère à empreintes moléculaires
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MTBE	Méthyltertiobutyléther
NACE	Non-aqueous Capillary Electrophoresis – Electrophorèse capillaire en milieu non aqueux
NIP	Non Imprinted Polymer - polymère non imprimé
SAX	Strong Anion Exchange – support échangeur anionique fort
SCX	Strong Cation Exchange – support échangeur cationique fort
SPE	Solid Phase Extraction - extraction solide-liquide

Chapitre I

Etude bibliographique des polymères à empreintes moléculaires
utilisés lors de la préparation d'échantillon
par extraction solide-liquide

I.1. RAPPEL HISTORIQUE SUR L'ADSORPTION SELECTIVE PAR IMPRESSION MOLECULAIRE – DEMARCHE DE L'IMPRESSION MOLECULAIRE

En 1931, le groupe de Polyakov observait un comportement d'adsorption inhabituel de particules de silice synthétisées en présence de dérivés benzéniques. Ce support minéral présentait une affinité élevée vis-à-vis d'un dérivé benzénique en présence duquel il avait été préparé.

Depuis ces premières observations, les investigations menées sur les matériaux imprimés ont été poursuivies sur la silice puis sur des polymères organiques, préparés pour la première fois par Wulff et Klotz en 1972.

A ce jour, un polymère à empreintes moléculaires (notation : MIP, du terme anglais Molecular Imprinted Polymer) est défini comme étant un matériau possédant des cavités spécifiques (en forme et en taille) d'une molécule ciblée.

Le nombre de publications parues au cours de ces quinze dernières années prouve l'essor des MIPs dans les domaines des biotechnologies (capteurs, membranes, sondes) et des méthodes séparatives (extraction solide-liquide (SPE), chromatographie en phase liquide (CPL), électrophorèse capillaire (EC) et électrochromatographie (CEC)) [1].

Nombre annuel de publications

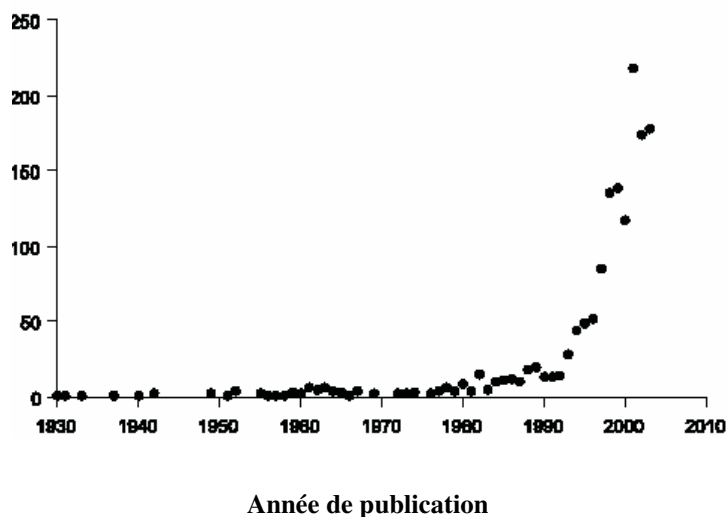


Figure I.1 : Evolution des publications portant sur les MIPs [1].

Un MIP est préparé à partir d'une molécule empreinte, molécule autour de laquelle le 'moulage' du polymère est réalisé. Des empreintes spécifiques à cette molécule sont formées. Le polymère est synthétisé à partir d'un mélange de monomères, les uns, fonctionnalisés, interagissent avec la molécule empreinte de façon covalente ou non (liaisons

hydrogène, interactions ioniques), les autres assurent la réticulation du polymère afin d'apporter une bonne tenue mécanique au matériau final. Le mélange constitué est dissous dans un solvant porogène, et l'addition d'un initiateur de polymérisation conduit à la formation d'un MIP en 24 heures environ. L'élimination de la molécule empreinte par des lavages, adaptés à la nature de la liaison monomère fonctionnel - molécule empreinte, laisse des sites capables de recapturer spécifiquement la molécule empreinte ou des molécules proches en taille et en structure (**Figure I.2**).

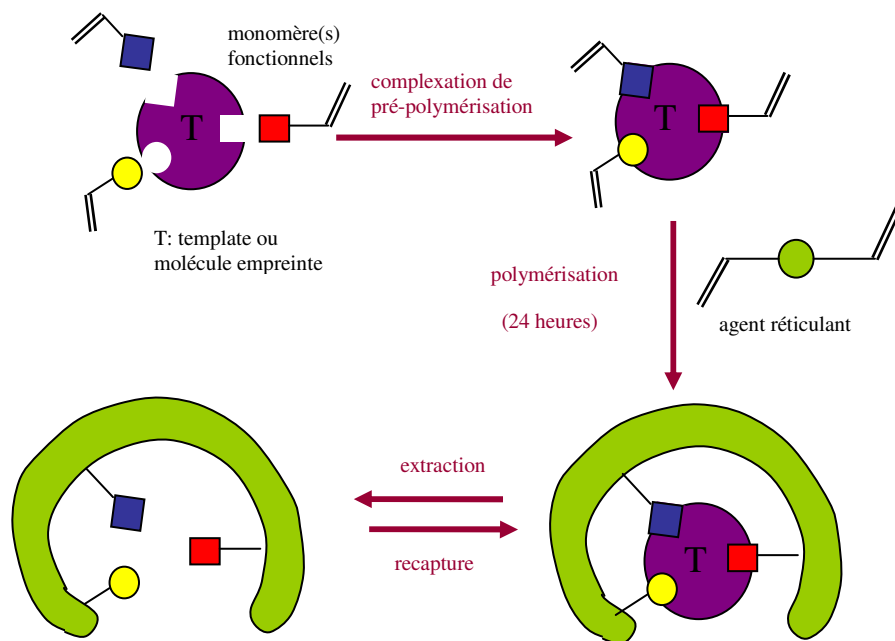


Figure I.2 : Principe de formation d'une empreinte moléculaire.

Les interactions entre le monomère fonctionnel et la molécule empreinte sont fortes (liaisons covalentes, liaisons hydrogène, interactions ioniques).

D.Spivak définit la sélectivité d'un MIP comme la conséquence de la formation de cavités de formes sélectives au sein de la matrice polymérique, issues de la préorganisation de groupes fonctionnels autour de la molécule empreinte [2].

Un polymère non imprimé (notation : NIP, du terme anglais Non Imprinted Polymer) est synthétisé en parallèle du MIP afin de comparer le pouvoir de rétention des deux matériaux et de vérifier la sélectivité de recapture du MIP par rapport au NIP vis-à-vis de la molécule empreinte.

Le choix des réactifs (monomères fonctionnels, agent réticulant, solvant porogène) et des protocoles de synthèse conditionne la stabilité du complexe de prépolymérisation et la nature des empreintes formées au sein du MIP.

I.2. DIFFERENTES APPROCHES

La qualité des empreintes formées dépend notamment de la force des interactions existant entre la molécule empreinte et le(s) monomère(s) fonctionnel(s) dans le mélange de prépolymérisation. Selon ce critère, trois principales voies de synthèse sont appliquées à ce jour.

a) Approche covalente

Les synthèses de MIPs par voie covalente ont été mises en place et étudiées par l'équipe de Wulff [3], celle de Shea [4] et celle de Damen et Neckers [5]. La molécule empreinte est liée de façon covalente à un ou deux groupes polymérisables. Lorsque la polymérisation est terminée, la liaison molécule - monomère est rompue par hydrolyse ou par réaction de clivage spécifique de la liaison ciblée. Cette liaison covalente est capable de se former à nouveau lorsque le polymère est en contact avec la molécule empreinte ou un analogue doté de la même fonction.

Seuls des composés ayant des groupements fonctionnels particuliers sont utilisés comme molécule empreinte: alcool avec la formation d'un ester, aldéhyde et amine avec la formation d'une base de Schiff. Une des principales procédures de l'approche covalente est la formation d'esters boroniques en présence de molécules empreintes de type 1,2 ou 1,3 diols. Des études ont été menées par l'équipe de Wulff avec des applications à des dérivés du mannose, de l'acide glycérique, d'acides aminés et d'acides α -hydroxycarboxyliques [6].

La synthèse de MIPs par voie covalente assure la présence de fonctions actives uniquement dans les sites capables, de par leur taille et leur forme, d'accueillir la molécule recherchée (molécule empreinte ou analogue). Ces fonctions réparties aléatoirement dans le polymère pourraient alors être à l'origine d'interactions non spécifiques et d'une diminution du pouvoir de reconnaissance spécifique de la molécule recherchée par le MIP. De plus, M.Gallego-Gallegos a montré une grande homogénéité des cavités formées par voie covalente, avec une affinité élevée de ces dernières pour la molécule empreinte [7].

Cependant, la cinétique de recapture est souvent lente et rend le processus covalent inadéquat pour les applications en CPL et SPE.

b) Approche non covalente

L'approche non covalente a été proposée dès les années 1990 par Sellergren [8] puis développée, étudiée et optimisée par de nombreuses autres équipes dont celle de Mosbach [9]. Les interactions monomère fonctionnel - molécule empreinte au cours de la polymérisation sont identiques à celles réalisées par la suite entre le polymère et la molécule recherchée lors de l'étape de recapture. Il s'agit d'interactions de nature non covalente (liaisons hydrogène, dipôle-dipôle, interactions ioniques, **Tableau I.1**).

Nature de l'interaction	Energie (kJ.mol⁻¹)
liaison hydrogène	25 – 40
dipôle-dipôle	25 – 40
ionique	250 – 1050
covalente	670 - 3360

Tableau I.1 : Nature et énergie des interactions covalente et non covalentes [10].

b-1) Monomère fonctionnel

La méthode non covalente utilise principalement des monomères fonctionnalisés (acide carboxylique, amine, amide, etc.) commercialisés (**Tableau I.2**). Parmi ces monomères, l'acide méthacrylique, les 4 et 2-vinylpyridine et l'acrylamide sont fréquemment utilisés, mais les synthèses récentes de MIPs font apparaître l'utilisation de monomères aux fonctions variées (alcool, phosphate).

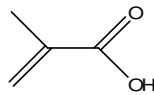
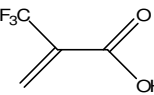
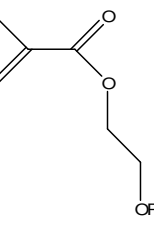
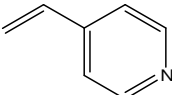
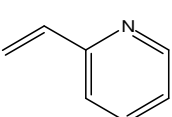
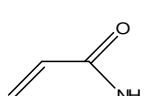
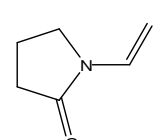
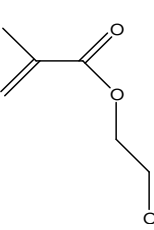
Nom et abréviation du monomère		Formule	Référence
Monomère acide	acide méthacrylique (MAA)		[11]
	acide (2-trifluorométhyl)acrylique (TFMAA)		[12-13]
	2-(méthacryloyloxy)éthylphosphate (MEP)		[22]
Monomère basique	4-vinylpyridine (4-VP)		[14-15]
	2-vinylpyridine (2-VP)		[15-16]
Monomère neutre	acrylamide (AA)		[17-19]
	vinylpyrrolidone		[20]
	2-hydroxyéthyl méthacrylate (HEMA)		[21]

Tableau I.2 : Monomères fonctionnels commercialisés (synthèse de MIPs par voie non covalente).

La variété des fonctions présentes dans les différents monomères permet d'optimiser la sélectivité et l'affinité du MIP pour la molécule recherchée en fonction des caractéristiques fonctionnelles de cette dernière.

α) Monomères acides et basiques:

L'acide méthacrylique (MAA) forme des complexes de prépolymérisation stables avec des molécules empreintes basiques par interactions ioniques et par liaisons hydrogène. D.Spivak et K.Shea montrent, par l'étude d'un MIP préparé à partir de MAA, que la force des interactions créées entre le monomère et la molécule empreinte conditionne l'affinité de l'empreinte lors de la recapture de la molécule empreinte [11]. Ainsi, des nucléobases dérivées de l'adénine, la cytosine et la guanine ont fourni des MIPs de grande affinité grâce à la présence de deux fonctions basiques voisines dans la structure 2-aminopyridine commune aux trois nucléobases (**Figure I.3 (a)**). Le caractère ionique de la liaison existant entre la fonction basique du noyau pyridinique de la guanine et la fonction acide du MAA renforce l'intensité de l'interaction monomère – molécule empreinte. Les auteurs ont mis en évidence l'existence de cette interaction ionique par une étude de la variation de l'affinité du MIP vis-à-vis de molécules aminopyridine en fonction du pH [2].

L'absence d'une des deux fonctions basiques diminue l'affinité de MAA vis-à-vis de la nucléobase (uracile et thymine, **Figure I.3 (b)**).

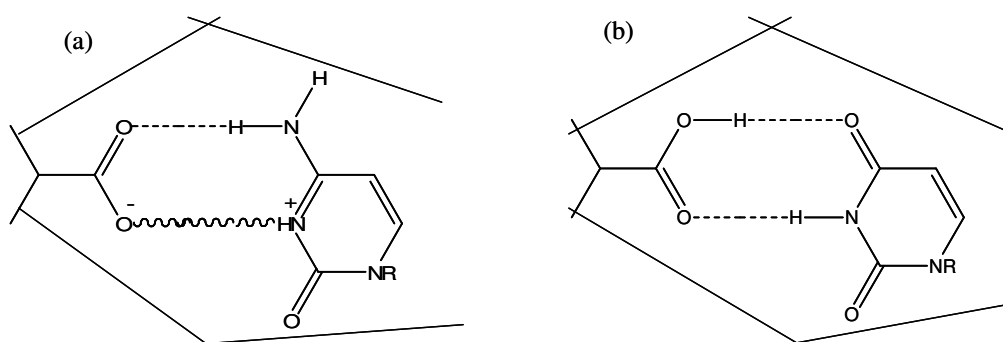


Figure I.3: Liaisons hydrogène (----) et ioniques (~~~~) entre MAA et (a) la guanine [11], et (b) l'uracile.

D'autre part, les interactions monomère acide – molécule empreinte basique sont d'autant plus intenses que la force de l'acide est élevée comme l'a montré J.Matsui et son équipe [13] en remplaçant MAA par TFMAA pour la synthèse d'un MIP à partir de la nicotine.

L'évaluation par chromatographie en phase liquide de l'affinité du MIP vis-à-vis de la nicotine fournit une augmentation notable du facteur de rétention lorsque MAA est remplacé par TFMAA. La comparaison des facteurs de rétention obtenus sur le MIP et le NIP a, en outre, prouvé une amélioration de la sélectivité du MIP par rapport au NIP avec TFMAA.

Dans le cas d'une molécule empreinte acide, la démarche est inversée. X.Huang a en effet montré que, lorsque la molécule empreinte possède une fonction acide carboxylique (acide salicylique), un monomère fonctionnel basique (4-VP) permet la formation d'interactions ioniques fortes, entraînant une reconnaissance de la molécule empreinte par le MIP supérieure à celle obtenue avec un monomère neutre donneur de liaisons hydrogène [14].

D'autre part, K.Möller a préparé un MIP à partir de la 2-VP, monomère basique capable d'interagir avec des composés acides forts tels que les dérivés diphenyle phosphates contenus dans une matrice urinaire [16].

Les deux monomères 2-VP et 4-VP ont été utilisés pour la synthèse de MIPs capables de retenir des herbicides de la famille des sulfonylurée par liaisons hydrogène et hydrophobes [15]. Une extraction sélective par SPE des molécules ciblées a été obtenue par percolation d'un solvant polaire et aprotique, l'acétonitrile.

Enfin, la diversification des interactions monomère – molécule empreinte augmente l'affinité et la sélectivité du MIP comme c'est le cas du polymère mixte MAA et 4-VP pour la rétention spécifique du paracétamol contenu dans le sérum ou l'urine [23]. La molécule empreinte est dotée de fonctions amide et alcool interagissant par liaisons hydrogène avec MAA et d'un noyau benzénique capable d'interagir par liaisons π - π avec la 4-VP.

β) Monomères neutres :

Dans le cas d'empreintes formées à partir de molécules neutres et polaires (amides), C.Yu et K.Mosbach ont souligné la capacité de l'AA à créer des liaisons hydrogène plus fortes que MAA dans un solvant polaire (ACN) ou protique (H₂O) [18]. L'explication théorique apportée par les auteurs repose en partie sur le moment dipolaire de la fonction amide dont la valeur est supérieure à celle de la fonction acide carboxylique. J.Xie confirme la force des liaisons hydrogène créées par l'AA à travers la synthèse et l'application à l'extraction solide-liquide en milieu polaire d'un MIP-quercétine [19]. Ainsi, le taux de récupération de la quercétine extraite du ginkgo est supérieur à 85 % après un lavage polaire et protique au cours duquel la quercétine est totalement retenue.

Dans le cas de l'impression de molécules très hydrophiles et de grande taille telles que les polypeptides, des MIPs préparés à partir d'AA ont apporté des résultats satisfaisants de recapture [24].

Des monomères sont parfois synthétisés à façon afin de répondre aux critères d'affinité et de spécificité fixés par les utilisateurs de MIPs. Ainsi, A.Kugimiya a montré les fortes affinité et spécificité obtenues par liaisons hydrogène entre la fonction N-méthylthiourée d'un monomère et le groupement phosphate des solutés contenus dans une matrice très polaire. L'auteur montre aussi que ces liaisons hydrogène sont inexistantes avec MAA [25].

Enfin, des MIPs ont été préparés en diversifiant les interactions monomères – molécule empreinte par introduction de deux types de monomères dans le mélange de prépolymérisation. C'est le cas du polymère mixte MAA-AA utilisé pour retenir sélectivement deux fongicides faiblement basiques (le diniconazol et le paclobutrazol) avec des recouvrements supérieurs à 60 % en milieu aqueux [26].

χ) Monomères de faible affinité:

Des monomères fonctionnels à faible pouvoir accepteur - donneur de liaisons hydrogène ont prouvé leur intérêt dans la diminution d'interactions non spécifiques, entraînant ainsi une augmentation de la spécificité du MIP vis-à-vis des molécules recherchées.

Ainsi, Kugimiya a montré une spécificité du MIP préparé à partir de MEP (2-(méthacryloyloxy)éthylphosphate)) vis-à-vis du cholestérol (molécule empreinte) supérieure à celle obtenue avec un MIP préparé à partir de TFMAA [22].

D'autre part, l'introduction du monomère hydrophile HEMA (2-hydroxyéthylméthacrylate) dans un copolymère MAA-EDMA a permis la diminution d'interactions non spécifiques hydrophobes en milieu aqueux comme le montre B.Diuron avec l'extraction d'une molécule base faible et moyennement polaire (bupivacaïne) présente dans une matrice aqueuse [21].

b-2) Stoechiométrie du mélange de prépolymérisation

Le nombre d'empreintes dépend du nombre de complexes de prépolymérisation formés, lui-même influencé par la stoechiométrie du mélange initial monomère fonctionnel/molécule empreinte (M/T). Ainsi, des MIPs sont généralement préparés avec un rapport M/T compris entre 2/1 et 10/1 [27-28] fixé en fonction du nombre de fonctions présentes dans la molécule

empreinte, dans le monomère fonctionnel, et selon la solubilité de la molécule empreinte dans le mélange de prépolymérisation.

E.Yilmaz montre avec plusieurs MIPs préparés à partir de théophylline (T) et de TFMAA (M) à des rapports M/T compris entre 4/1 et 5000/1 que celui à 500/1 était encore capable de capturer davantage de théophylline que le NIP [29]. L'auteur interprète ces résultats par le fait que la diminution du nombre de sites de rapport M/T élevé est compensée par la présence de sites de forte affinité grâce au déplacement de l'équilibre de prépolymérisation vers la formation d'un complexe stable.

Le tracé d'isothermes de Langmuir tiré d'équilibre d'adsorption évalue le nombre apparent maximal de sites de forte affinité à 40,9 nmol/g, ce résultat correspond au rapport M/T égal à 12/1. En outre, l'affinité des sites mesurée par la constante apparente de dissociation augmente avec le ratio M/T, une affinité optimale est obtenue pour un rapport M/T égal à 100/1.

c) Approche semi-covalente

La voie semi-covalente consiste en la formation des empreintes par voie covalente et la recapture de la molécule empreinte ou molécule analogue par voie non covalente.

J.U.Klein a réalisé la synthèse d'un MIP à partir d'un monomère (4-vinylphénol) lié de façon covalente à la molécule empreinte (cholestérol) par une fonction carbonate, soit le (4-vinyl)phenylcarbonate ester [30]. Une hydrolyse basique rompt la fonction ester carbonate, libère le dioxyde de carbone et permet l'élimination de la molécule empreinte par des lavages à l'éther. L'élimination du bras espaceur ester carbonate apporte suffisamment d'espace à la molécule empreinte pour s'insérer dans la cavité et créer une liaison hydrogène avec le site actif (phénol) lors des expériences de recapture (**Figure I.4**).

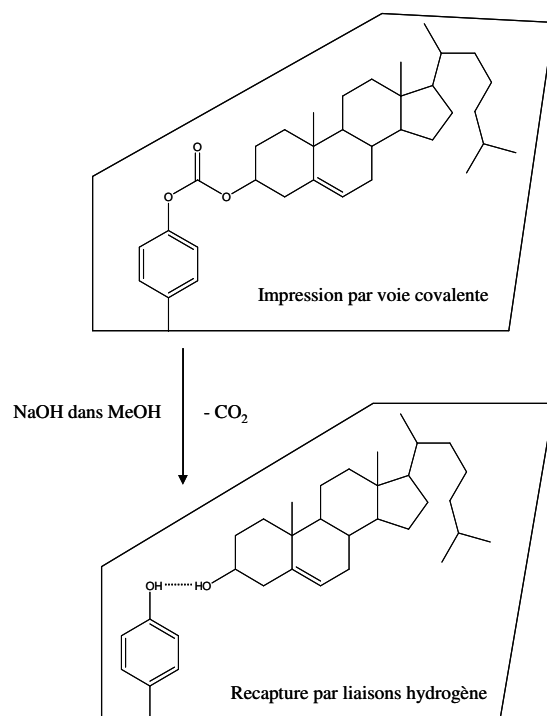


Figure 1.4 : Approche semi-covalente illustrée à partir du (4-vinyl)phénylcarbonate de cholestéryle. Schéma adapté de [31].

La sélectivité du MIP par rapport au NIP et la spécificité des empreintes vis-à-vis du cholestérol ont été démontrées par les auteurs.

C.C.Hwang a suivi une démarche similaire [31] et a montré que la quantité de cholestérol recapturée était supérieure avec un MIP préparé selon une approche semi-covalente par rapport à celle obtenue avec des MIPs préparés selon une approche non covalente (MAA ou 4-VP). Le nombre de sites théoriquement formés devant être le même pour les trois MIPs, les résultats révèlent l'affinité élevée des empreintes formées selon une approche semi-covalente en comparaison de celle des empreintes de forme plus aléatoire obtenues par voie non covalente.

La synthèse d'un MIP à partir de MAA comme monomère fonctionnel pour l'extraction du 4-nitrophénol contenu dans des échantillons d'eau a été réalisée par approches semi-covalente et non covalente [32]. Ainsi, E.Caro a confirmé l'affinité plus élevée du MIP préparé par voie semi-covalente. En revanche, l'auteur a montré la meilleure spécificité d'extraction de la molécule empreinte contenue dans une matrice complexe par le MIP synthétisé par voie non covalente.

d) Conclusion

Parmi ces trois principales approches, la voie non covalente est généralement choisie pour la simplicité de sa mise en œuvre, et pour la large gamme de monomères commerciaux disponibles.

I.3. VOIES DE SYNTHÈSE DES POLYMERES A EMPREINTES MOLECULAIRES

Un MIP est dans la majorité des cas un copolymère, soit une macromolécule obtenue à partir de la répétition d'unités de deux natures distinctes, monomère fonctionnel et agent réticulant. La synthèse des MIPs a généralement lieu par processus radicalaire (Annexe IV, partie E) car ce dernier est peu sensible à la présence d'impuretés et permet l'utilisation de solvants de polarités variables [33]. Selon l'approche non covalente, les MIPs sont préparés à partir de solvants porogènes de polarité adaptée à la solubilité de la molécule empreinte et à l'interaction de cette dernière avec les monomères.

a) Format des polymères

a-1) Particules de formes irrégulières

Le mode de préparation des MIPs le plus largement répandu fait usage de la polymérisation en masse. L'énergie nécessaire à la polymérisation est apportée par voie thermique (bain marie à 60°C) ou par voie photochimique (lampe UV à une température comprise entre 4°C et 15°C). Le monolithe dur, nommé bulk, est broyé et tamisé afin d'obtenir une population de particules homogène en taille. La figure I.5 retrace les principales étapes de la synthèse d'un MIP en bulk, depuis le mélange des réactifs jusqu'à l'obtention des particules.

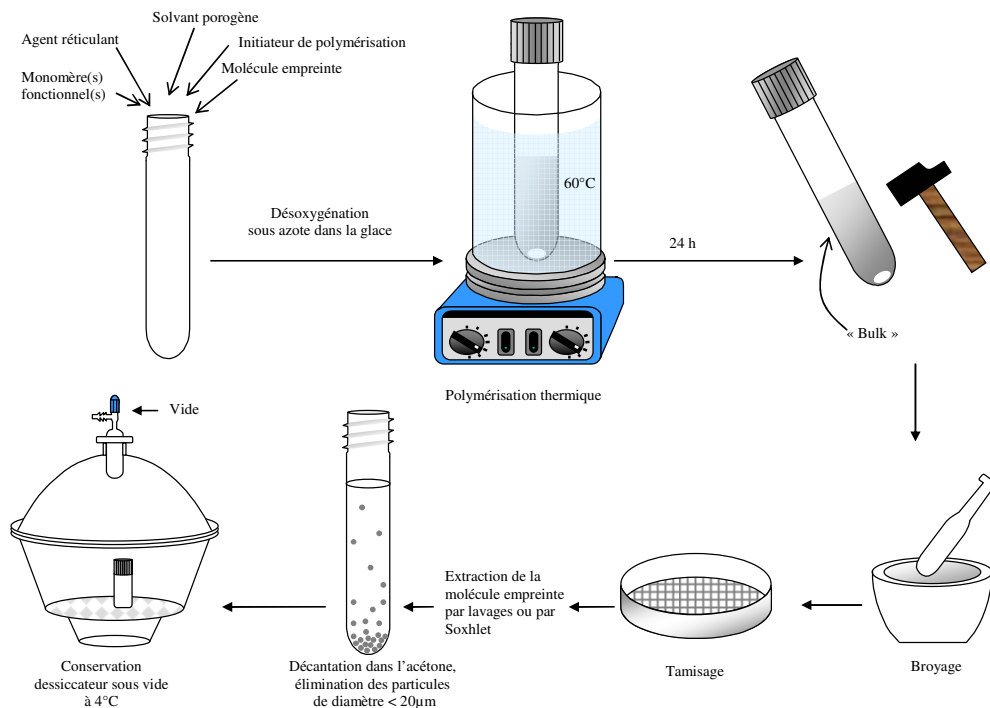


Figure I.5 : Schéma de synthèse d'un MIP en bulk.

Cette méthode présente l'avantage d'être simple et nécessite peu de matériel. C'est la raison pour laquelle elle sera utilisée dans les chapitres II et III pour la préparation des MIPs.

Les particules sont souvent de formes et de tailles irrégulières et le broyage est une étape longue pouvant entraîner des pertes de polymère. Ces dernières années, des méthodes ont été développées afin d'augmenter les rendements et d'obtenir des particules de taille et de forme homogènes, sans étape de broyage.

a-2) Billes de taille homogène

Quatre démarches permettent l'obtention de particules sphériques.

La méthode la plus simple expérimentalement est la polymérisation par précipitation. Cette dernière repose sur une dilution du mélange de monomères et de la molécule empreinte dans le solvant porogène. Ce solvant porogène est choisi de façon à ne pas entraver les interactions molécule empreinte - monomère fonctionnel, déjà affaiblies par la dilution. Les particules obtenues sont à l'échelle du micron et le rendement final est élevé car l'intégralité des particules est récupérée par centrifugation [34-35].

La polymérisation en suspension permet, comme la précédente méthode, d'obtenir des particules sphériques. Le mélange de prépolymérisation (molécule empreinte, monomère(s) fonctionnel(s), agent réticulant, solvant porogène et initiateur de polymérisation) est introduit dans une phase aqueuse contenant un agent dispersant dont la proportion conditionnera la taille des grains (50-250 μm) de MIP. La polymérisation se déroule sous agitation rapide (≈ 350 rpm) [36].

Des liquides perfluorés très peu miscibles avec la plupart des molécules organiques, peuvent remplacer l'eau de manière à ne pas gêner l'impression par voie non covalente [37-38], l'agent dispersant est un surfactant perfluoré.

Une méthode économique de polymérisation en suspension dans de l'huile minérale, en l'absence de tout surfactant a été mise en place [39]. Le mélange de prépolymérisation est introduit dans un grand volume d'huile et dispersé sous agitation vigoureuse (13 500 rpm, durée : 3 minutes) puis soumis à un rayonnement UV transformant les gouttelettes du mélange de prépolymérisation en solide. Des billes de diamètre compris entre 1 et 100 μm sont obtenues. La capacité des billes a été prouvée comme étant supérieure à celle des particules préparées sous forme de bulk broyé avec un mélange identique de monomères.

La polymérisation "multi-step swelling" utilise des billes de polystyrène comme support de MIP. Les billes sont mises en suspension, sous agitation, dans différentes solutions entraînant leur gonflement. Au terme de trois étapes de gonflement, d'une durée de 2 à 3 heures chacune, les billes sont mises en contact des réactifs nécessaires à la synthèse du MIP (molécule empreinte, monomère, agent réticulant, solvant porogène). L'étape ultime est la polymérisation en surface des billes de polystyrène gonflées (durée 20 heures). Ce protocole permet d'obtenir une distribution étroite en taille des particules [40]. Cependant, la durée de la synthèse lui fait préférer la polymérisation en suspension si l'homogénéité parfaite en taille des particules n'est pas nécessaire. L.Zhang montre des résultats de spécificité de recapture de la molécule empreinte similaires pour un MIP préparé selon deux voies distinctes : polymérisation en suspension et "multi-step swelling" [36].

Enfin, une démarche différente des trois précédentes consiste à immobiliser par greffage la molécule empreinte en surface de silice poreuse. La réaction de polymérisation avec le monomère fonctionnel et l'agent réticulant a ensuite lieu au sein des pores des billes de silice. La dissolution du gel de silice donne des billes de polymère à structure poreuse et imprimée en surface uniquement. Toutes les empreintes sont accessibles par les pores et permettent

ainsi d'améliorer la capacité ainsi que la cinétique de recapture de la molécule empreinte ou de molécules analogues [41-42].

Une alternative à la formation de particules d'homogénéité de taille et de forme variable est la préparation d'un polymère sous forme de monolithe poreux *in situ*, à savoir directement dans une colonne CPL [43-44]. Ce processus présente un réel intérêt lorsque le MIP est utilisé à des fins analytique ou de préparation d'échantillon en ligne.

b) Réactifs de polymérisation

Dans cette partie, nous n'évoquerons que les conditions propres à la synthèse de MIPs par voie non covalente, méthode expérimentale que nous avons utilisée pour les préparations de MIPs dans la suite du manuscrit.

b-1) Molécule empreinte

α) Sélection :

La molécule empreinte doit être représentative des molécules ciblées dans l'échantillon. La ressemblance entre la molécule empreinte et les molécules recherchées doit tout autant porter sur leur taille et leur forme que sur la nature, la position et l'orientation spatiale de leurs groupes fonctionnels [45]. Ainsi, une étude menée sur un MIP préparé à partir de testostérone montre l'importance du positionnement des deux sites donneur et accepteur de liaisons hydrogène de cette molécule empreinte pour la reconnaissance ultérieure de molécules analogues [46].

La sélection de la molécule empreinte s'appuie sur l'évaluation de la stabilité du complexe de prépolymérisation. Il est aussi possible de déterminer expérimentalement la position des sites d'interaction entre la molécule empreinte et un monomère fonctionnel, ainsi que d'estimer la stoechiométrie du complexe formé. Ce travail est souvent réalisé par spectrométries RMN ou UV avec ajout de quantités croissantes de monomère à une solution contenant la molécule empreinte. La variation du déplacement chimique (RMN) ou de bandes d'absorbance (UV) caractéristiques de la molécule empreinte est liée aux énergies mises en jeu ainsi qu'à la stoechiométrie des complexes [47-48]. Par ailleurs, ces études ont mis en évidence le phénomène d'association de la molécule empreinte avec elle-même dans le mélange de prépolymérisation [49].

Des bibliothèques de modélisation virtuelle évaluent le nombre et l'intensité des interactions existant entre la molécule empreinte et les monomères [50-52]. Les mélanges de monomères

proposés par la modélisation peuvent être testés en chimie combinatoire par la préparation d'un grand nombre de MIPs en faibles quantités (mini "MIPs"). La corrélation des sélectivités obtenues pour des MIPs préparés à petite et grande échelles est satisfaisante [21,53].

β) Phénomène de relargage ou "bleeding" :

En extraction solide-liquide, une perte de la molécule empreinte encore présente dans la matrice polymérique est observée et peut entraîner des erreurs de dosage importantes particulièrement lors du dosage de composés présents à l'état de traces dans l'échantillon [54-56]. Afin de prévenir cette difficulté, le MIP est traité par des lavages successifs avec un solvant capable de rompre efficacement les interactions molécule empreinte - monomère (MeOH/AcOH pour les liaisons hydrogène), par une extraction Soxhlet à chaud ou par une extraction ASE (Accelerated Solvent Extraction) [57-58]. L'épuisement du MIP est aussi réalisé en percolant une phase mobile à fort pouvoir éluant à travers une colonne remplie de particules de MIP [45].

Cependant, le relargage de la molécule empreinte reste toujours possible lors d'une analyse, c'est la raison pour laquelle l'impression par une molécule analogue en structure, nature et positionnement des groupes fonctionnels, est fréquemment appliquée [59]. Le terme anglais utilisé pour définir le rôle de ces molécules empreintes, différentes des molécules ciblées, est "dummy" qui signifie "feinte". Lors du choix de la molécule empreinte, J.Wang souligne l'importance de la position du ou des groupe(s) fonctionnel(s) responsable(s) des interactions fortes au sein de l'empreinte [60]. L'auteur montre aussi l'influence de l'encombrement stérique des substituants proches des groupes fonctionnels nécessaires à la reconnaissance du composé par l'empreinte. La taille des molécules cible a un effet non seulement sur le mécanisme de reconnaissance par les empreintes mais aussi sur l'accessibilité des molécules aux empreintes par les macro-, meso- et micropores [61].

Afin d'assurer la reconnaissance du MIP pour la molécule ciblée, cette dernière marquée au deutérium (ou autre isotope d'atomes présents dans la molécule) peut constituer la molécule empreinte [62]. La comparaison de deux MIPs, préparés à partir de bisphénol A pour l'un et de bisphénol A deutéré pour l'autre, a montré un pouvoir de reconnaissance identique pour les deux polymères.

Lorsque la molécule ciblée est instable dans les conditions de polymérisation ou lorsque cette dernière peut réagir avec les autres monomères, l'utilisation d'un analogue stable, comme molécule empreinte, est préférée [57].

b-2) Solvant porogène

Le rôle du solvant porogène est de créer un réseau poreux capable d'acheminer les molécules jusqu'aux empreintes. La taille des pores dépend de la nature du solvant porogène ainsi que du volume de solvant porogène introduit dans le mélange de prépolymérisation. Classiquement, le volume de solvant porogène utilisé pour la préparation d'un bulk est calculé grâce à la relation [I.1] tirée de [63]:

$$V_{\text{solvant porogène}} / (V_{\text{solvant porogène}} + V_{\text{monomères}}) = 0,57 \quad [\text{I.1}]$$

Le solvant porogène doit aussi favoriser les interactions molécule empreinte - monomère et la stabilité du complexe formé. Lorsque des liaisons hydrogène ou des interactions ioniques sont mises en jeu, les meilleurs résultats sont obtenus avec des solvants à faible caractère donneur ou accepteur de liaisons hydrogène et peu polaires (toluène, chloroforme, dichlorométhane). Toutefois, quand la solubilisation de la molécule empreinte dans le mélange de prépolymérisation l'impose, un solvant polaire (acétonitrile) est choisi [64].

Lors du processus SPE, la reconnaissance de la molécule empreinte par le MIP est optimale dans le solvant de polymérisation (solvant porogène). En effet, le polymère reprend la même structure microscopique que celle adoptée en cours de synthèse. Ainsi, les interactions établies entre la molécule empreinte et les monomères au cours de la synthèse du MIP se reproduisent à l'identique [2,65]. Certains auteurs parlent d'effet d'impression du solvant porogène [66] pour exprimer l'influence du solvant porogène sur le comportement du polymère.

Enfin, la spécificité de recapture d'une molécule ciblée par un MIP est optimale lorsque les interactions non spécifiques fortes (liaisons hydrogène ou interactions ioniques) entre le soluté et le polymère sont éliminées. Ces conditions sont souvent atteintes avec le solvant porogène auquel a été ajouté un modificateur de nature donneur ou accepteur de liaisons hydrogène, acide (acide acétique) ou basique (diéthylamine) [67-68].

b-3) Agent réticulant

L'agent réticulant a comme rôle d'assurer la stabilité mécanique du polymère. Cinq agents réticulants sont répertoriés dans le tableau I.3, parmi lesquels l'EDMA, le TRIM et le DVB sont les plus fréquemment rencontrés.

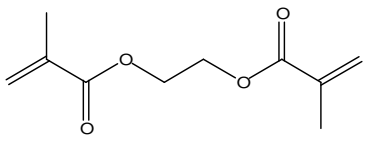
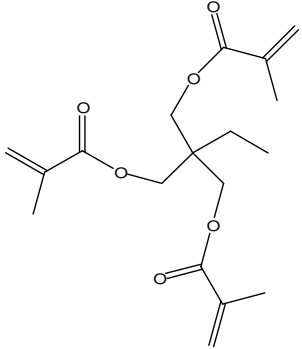
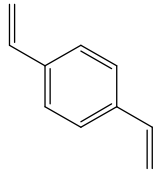
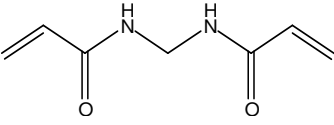
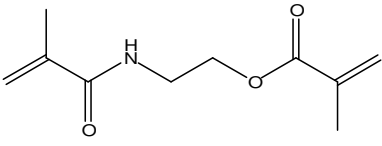
Nom de l'agent réticulant (abréviation)	Formule
Ethylène glycol diméthacrylate (EDMA ou EGDMA)	
Triméthylpropanetriméthacrylate (TRIM)	
Divinylbenzène (DVB)	
N,N'-Méthylène-bis-acrylamide (MDAA)	
N,O-bisméthacryloyléthanolamine (NOBE)	

Tableau I.3 : Agents réticulants [69].

La sélection d'un agent réticulant porte non seulement sur un critère de stabilité du matériau final mais aussi sur celui d'interactions possibles entre la molécule empreinte et le polymère.

α) Sélection :

Depuis une dizaine d'années, l'influence de la réticulation du réseau polymérique sur la reconnaissance du MIP vis-à-vis de la molécule empreinte a été étudiée. Ces investigations ont conduit certaines équipes à utiliser des agents de réticulation contenant un nombre de

groupements polymérisables supérieur à deux. Ainsi, M.Kempe a observé, à partir d'un MIP préparé pour la recapture d'un dipeptide, une augmentation de la capacité et de la sélectivité lorsque le TRIM (3 liaisons vinyliques) remplace l'EDMA (2 liaisons vinyliques) [70].

D'autre part, l'hydrophobie du TRIM, supérieure à celle de l'EDMA, favorise la reconnaissance des molécules contenues dans des matrices aqueuses peu favorables au développement des liaisons hydrogène. Ainsi, J.Xie explique la spécificité de l'extraction, par SPE, de la quercétine contenue dans du plasma de rat grâce aux interactions hydrophobes entre la molécule ciblée et le TRIM [71]. Un rendement d'extraction de 67 % a été obtenu.

Lorsque le caractère polaire de la matrice polymérique doit être minimisé afin de réduire les interactions non spécifiques (dipôle-dipôle ou liaisons hydrogène), le divinylbenzène (DVB), plus hydrophobe, est préconisé [29].

Cependant, la nature de l'agent réticulant conditionne la mouillabilité du matériau par les solvants des différents échantillons déposés en SPE ou par ceux des phases mobiles utilisées en CPL. Dans le cas de synthèses et d'applications des MIPs en milieu aqueux, un agent réticulant hydrophile tel que le MDAA peut être utilisé [72].

Enfin, M.S.Sibrian-Vazquez [73] a proposé de simplifier la préparation d'un MIP en remplaçant le couple monomère fonctionnel – agent réticulant par un seul agent réticulant, capable d'assurer la reconnaissance de la molécule empreinte. Le copolymère est alors remplacé par un homopolymère. Des résultats satisfaisants ont été obtenus avec le NOBE qui a permis la recapture d'acides aminés ou de dipeptides, soit en milieu organique par des liaisons hydrogène, ou en milieu aqueux par des liaisons hydrophobes.

En conclusion, si les performances d'un MIP dépendent principalement de l'intensité des interactions monomère fonctionnel – molécule empreinte, la nature de l'agent réticulant est un paramètre à considérer attentivement.

β) Proportion d'agent réticulant :

La quantité d'agent réticulant dans le mélange de prépolymérisation est telle que :

$$N_{\text{monomère fonctionnel}} / N_{\text{agent réticulant}} \approx 1/5 \quad (\text{mole/mole}) \quad [\text{I.2}]$$

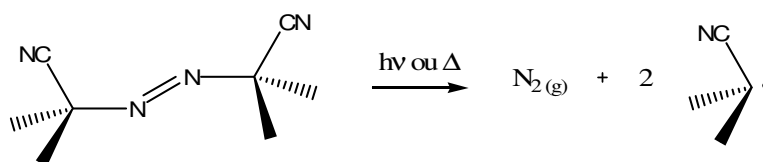
Le polymère présente donc un excès d'agent réticulant, avec un pourcentage massique généralement supérieur à 80 % [69]. Ces proportions varient en fonction de la finalité du MIP. Ainsi, un polymère très réticulé donne un matériau très rigide avec des empreintes correctement formées; ceci est favorable à l'application des MIPs aux séparations chirales par CPL. En revanche, une réticulation élevée diminue la flexibilité des chaînes polymériques et peut empêcher l'accès des molécules aux empreintes à travers les pores. La diminution du transfert de masse qui en découle est néfaste à l'application des MIPs en SPE [74].

En conclusion, les quantités de molécule empreinte (T), de monomère fonctionnel (M) et d'agent réticulant (CL) introduites dans le mélange de prépolymérisation répondent fréquemment au rapport molaire 1 : 4 : 20 / T : M : CL. Une étude de l'affinité et de la sélectivité de MIPs préparés à partir de proportions variables en réactifs permet de définir les conditions optimales pour la synthèse d'un MIP en quantités importantes et son application à des extractions sélectives [60].

Les travaux présentés dans les chapitres suivants reportent la synthèse de MIPs dans les proportions molaires 1 : 8 : 40 / T : M : CL. Ces conditions sont favorables à la solubilité de la molécule empreinte dans le mélange réactionnel ainsi qu'à la stabilité du complexe de prépolymérisation et à la tenue mécanique du polymère final.

b-4) Initiateur de polymérisation

L'initiateur de polymérisation radicalaire le plus couramment utilisé est l'AIBN (azo-bis-isobutyronitrile) qui se décompose tant sous l'influence de la chaleur (60°C) que par voie photochimique :



L'ABDV (2,2'-azo-bis-(2,4-diméthylvaléronitrile)) génère des radicaux libres à une température de 40°C et permet ainsi de travailler dans des conditions de polymérisation plus "douces" thermiquement [69].

En effet, la température a des conséquences variables sur la stabilité du complexe formé entre le monomère fonctionnel et la molécule empreinte ainsi que sur la réaction de polymérisation. Y.Lu souligne qu'une élévation de la température diminue la stabilité du complexe de prépolymérisation mais augmente le rendement de la réaction de polymérisation, et de ce fait le nombre de sites d'impression [75]. S.Le Moullec mentionne aussi l'influence de la température de synthèse d'un MIP par voie photochimique pour la recapture de dérivés d'acides alkyl méthylphosphoniques. Ainsi, la sélectivité du MIP préparé à 4°C est meilleure que celle du MIP obtenu à 15°C, ces résultats semblent indiquer de meilleures conditions de formation des empreintes à basse température, même si d'autres paramètres tels que la nature et la quantité de solvant porogène ont été simultanément modifiés dans le protocole de synthèse du MIP [76].

c) Caractérisation du MIP

La caractérisation du MIP consiste à mettre en évidence la formation des empreintes et à évaluer leur nombre et leur affinité pour la molécule ciblée. Ces résultats sont complétés par une étude de la morphologie du matériau (taille, forme des particules, porosité et surface spécifique).

c-1) Mise en évidence de la formation d'empreintes

L'étude de la formation d'empreintes au sein d'un MIP est réalisée par trois méthodes : CPL analytique, CPL frontale et équilibres de recapture par batch.

L'évaluation du MIP par CPL analytique consiste à injecter une solution contenant la molécule empreinte sur une colonne remplie de particules de MIP, à travers laquelle circule une phase mobile constituée majoritairement du solvant porogène. La même expérience est réalisée sur une seconde colonne remplie de NIP. Le facteur d'impression, noté I , est défini comme le rapport des facteurs de rétention de la molécule empreinte sur le MIP et le NIP, soit $I = k_{MIP}/k_{NIP}$.

Ce facteur d'impression indique la présence de sites spécifiques de reconnaissance dans le MIP ; lorsqu'il est supérieur à l'unité, la molécule étudiée présente une affinité spécifique pour les empreintes du MIP. Le facteur d'impression dépend du rapport entre le nombre d'interactions spécifiques propres aux empreintes et le nombre d'interactions non spécifiques dues à la matrice polymérique, soit la sélectivité du MIP par rapport au NIP [46].

L'évaluation thermodynamique du MIP consiste à mesurer la quantité de molécules empreintes adsorbées par ce polymère à l'équilibre. Ces expériences reproduites, à température constante, avec des masses variables de MIP ou à des concentrations variables en molécule empreinte ont leurs résultats reportés sous forme de courbes, connues sous le terme d'isothermes d'adsorption.

La recapture est réalisée par CPL frontale, ou bien en vials, par batch.

L'analyse frontale exploite le volume de fin de fixation du soluté présent dans la phase mobile percolée à travers une colonne remplie de polymère (**Figure I.10**, § I.4.a-1). La quantité de soluté adsorbée sur le polymère (MIP ou NIP), à l'équilibre, est déterminée à partir du volume de fin de fixation [77]. Il y a autant d'analyses frontales que de valeurs de concentration de soluté étudiées ; chacune de ces analyses apporte un point expérimental caractérisé par la concentration dans la phase mobile et la quantité adsorbée à l'équilibre.

La méthode par batch est la plus courante car très simple à mettre en oeuvre. Les isothermes d'adsorption sont représentées de différentes façons, l'ordonnée reporte :

- soit la quantité adsorbée, notée B ou S_b ,
- soit la fraction de molécule empreinte adsorbée par le polymère (B/T ou S_b/T) où T est la quantité de molécule empreinte introduite initialement dans le vial.

L'abscisse reporte :

- soit la concentration F de molécule empreinte non adsorbée,
- soit la masse de polymère introduite dans chaque vial.

La même courbe est tracée pour le NIP et comparée à celle du MIP. Indépendamment des fonctions mathématiques liées à chaque isotherme, si l'isotherme du MIP croît plus rapidement que celle du NIP, on peut alors conclure à la formation d'empreintes dans le MIP (**Figure I.6 (a)**).

$t = 0$: Solution contenant la molécule empreinte (concentration T) en présence de polymère (5 – 100 mg).

t_{eq} : Solution finale contenant la molécule empreinte en présence de polymère ayant adsorbé S_b (nmole) de molécule empreinte.

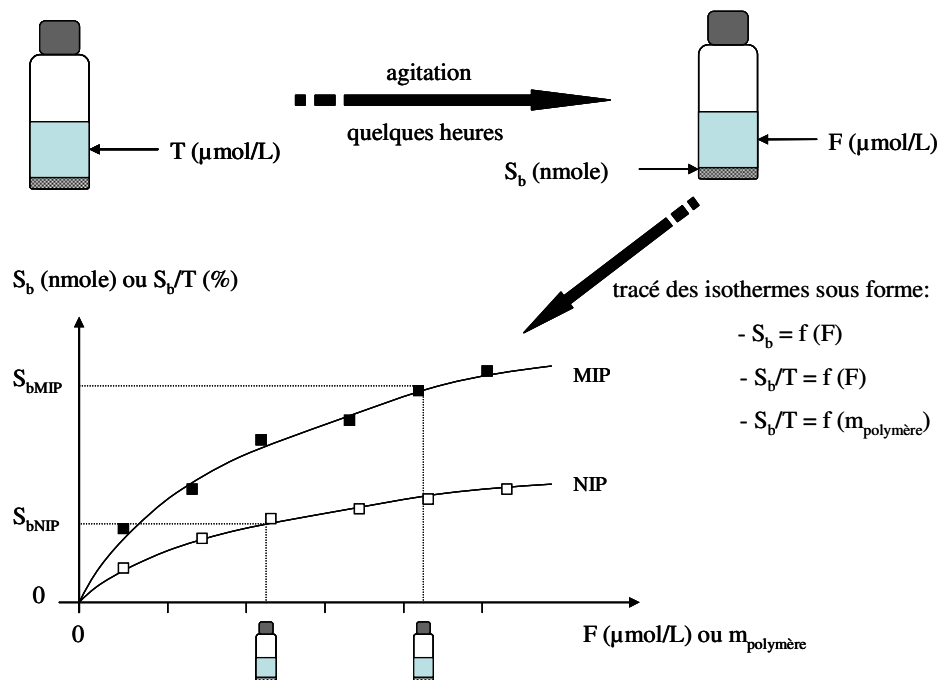


Figure I.6 (a): Tracé des isothermes d'adsorption de la molécule empreinte par le MIP.

Selon Q.Z.Zhu, la présence d'interactions non spécifiques est identifiable par l'allure de l'isotherme d'adsorption du MIP [78]. Si les interactions non spécifiques sont nulles :

- un plateau de saturation sur la courbe du MIP est obtenu à partir d'une certaine valeur de F (**Figure I.6 (b)**),
- la quantité de molécule empreinte adsorbée par le NIP est nulle, quelle que soit la concentration initiale introduite dans le vial.

Ces résultats permettent d'apprécier le pouvoir de la matrice polymérique et du solvant de recapture à développer des interactions non spécifiques.

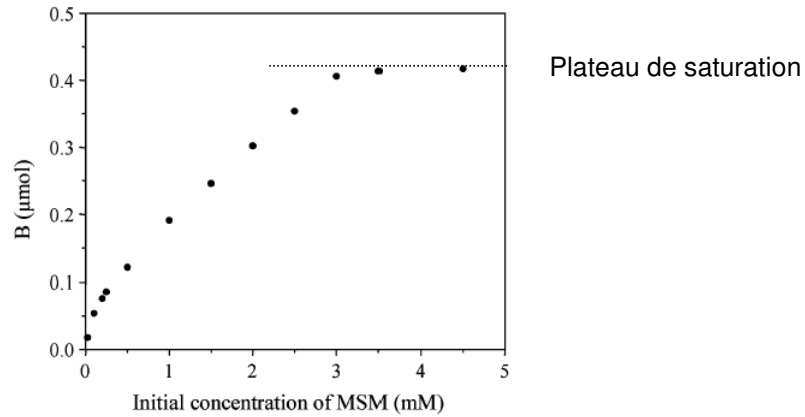
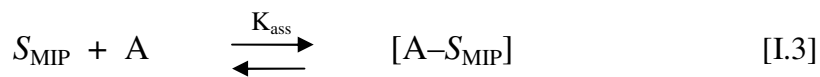


Figure I.6 (b): Isotherme d'adsorption d'un MIP préparé à partir de metsulfuron-methyl (MSM) tracée en fonction de la concentration initiale (notée T dans la figure I.6 (a)) de MSM introduite [78]. (B correspond à S_b de la figure I.6 (a)). (Isotherme d'adsorption du NIP non montrée).

c-2) Evaluation du nombre et de l'affinité des empreintes

Le nombre apparent et l'affinité des empreintes formées au sein du MIP ont des conséquences sur la capacité et la spécificité de reconnaissance du MIP. L'association d'une molécule empreinte, notée A, avec un site de reconnaissance, noté S_{MIP} , forme le complexe $[A-S_{MIP}]$ selon l'équilibre suivant:



$$K_{ass} = \frac{a_{[A-S_{MIP}]}}{a_{S_{MIP}} \cdot a_A} \quad [I.4]$$

$a_{[A-S_{MIP}]}$, $a_{S_{MIP}}$, a_A sont les activités des espèces actives à l'équilibre.

Or, S_{MIP} et $[A-S_{MIP}]$ sont des corps en phase condensée, assimilés à des corps purs. On pose:

$$a_{[A-S_{MIP}]} = 1 \quad \text{et} \quad a_{S_{MIP}} = 1.$$

Soit F, la concentration en soluté A resté en solution à l'équilibre. La solution est diluée ($\gamma_A = 1$) donc $a_A = F$ (mol/L).

L'expression de K_{ass} est simplifiée et ne dépend que de F :

$$K_{ass} = 1/F \quad (\text{L/mol}) \quad [I.5]$$

A l'équilibre, la constante d'association K_{ass} révèle l'affinité du polymère vis-à-vis du soluté A.

Lorsqu'un seul type d'interaction intervient, la fonction $S_b/F = f(S_b)$ est une droite de pente ($-K_{\text{ass}}$) et d'ordonnée à l'origine $S_{\text{bmax}} \cdot K_{\text{ass}}$, selon l'équation:

$$S_b/F = - S_b \cdot K_{\text{ass}} + S_{\text{bmax}} \cdot K_{\text{ass}} \quad [\text{I.6}]$$

Ainsi, une pente élevée en valeur absolue traduit une forte affinité du MIP vis-à-vis de la molécule empreinte.

Dans le cas d'un MIP, la courbe expérimentale est hyperbolique et traduit l'existence de plusieurs types d'interactions. L'équation mathématique de cette courbe permet de connaître, à partir de deux asymptotes linéaires, les caractéristiques des sites de faible et de forte affinité (**Figure I.7**) [60, 79].

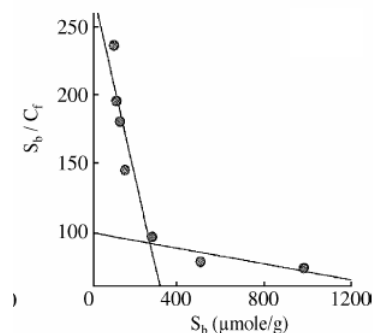


Figure I.7: Isotherme de Scatchard tracée pour un MIP caractéristique de la (S)- cyclohexyl(phenylethyl)amine [80] (C_f représente F dans l'équation [I.6]).

La représentation de Scatchard permet de visualiser l'hétérogénéité des sites de reconnaissance et de caractériser les sites de plus hautes et faibles affinités.

Pourtant, les empreintes formées par la voie non covalente montrent une telle hétérogénéité que le modèle de Scatchard est parfois insuffisant [81]. Le modèle de Freundlich ($S_b = f(F)$) fait l'hypothèse d'une distribution continue de l'énergie des empreintes, prenant en compte l'hétérogénéité des sites d'adsorption. L'expression mathématique de l'isotherme de Freundlich s'exprime par la relation suivante:

$$S_b = a.F^m \quad [I.7]$$

Où m est l'indice d'hétérogénéité ($0 < m < 1$). Lorsque m est proche de 1, la surface du polymère tend à être homogène. De plus, les paramètres de Freundlich, a et m , permettent de tracer des courbes de distribution d'affinité $N = f(K_{ass})$ (N : nombre apparent de sites, K_{ass} : constante d'association propre à chaque famille de sites). Ces dernières réalisées dans les mêmes conditions pour deux MIPs distincts apportent des outils de comparaison de ces deux matériaux. Un MIP est d'autant plus spécifique de la molécule empreinte ou de ses analogues que les sites correspondant aux valeurs de K_{ass} élevées constituent une population nombreuse [82].

Ces isothermes sont aussi tracées avec des solutions contenant à la fois la molécule empreinte et des molécules analogues, compétitives de la précédente vis-à-vis des empreintes du MIP. Le tracé d'isothermes pour chaque espèce permet d'évaluer l'affinité du MIP vis-à-vis de chacune d'elles ainsi que le degré de spécificité du MIP vis-à-vis de la molécule empreinte. Cette démarche a été suivie par G. Yang avec l'aminoantipyrine comme molécule empreinte et l'antipyrine comme molécule compétitive [83].

La caractérisation du MIP préparé pour l'extraction du tamoxifène contenu dans les urines (chapitre III) sera réalisée par isothermes de Freundlich afin de comparer deux protocoles de synthèse de MIPs différents.

c-3) Porosité, surface spécifique

La comparaison des matériaux polymériques par tracé d'isothermes peut être complétée par une étude morphologique. La taille des pores et la surface spécifique sont évaluées par porosimétrie à mercure et par tracé des isothermes d'adsorption d'azote selon la méthode BET (Brunauer, Emmet and Teller) [80]. La porosité conditionne la vitesse du transfert de masse des molécules à travers le matériau polymérique. La taille des pores (macro, méso et micro) dépend des conditions de synthèse, i.e. la nature, la proportion en solvant porogène, celle en agent réticulant ainsi que la température [75].

Des clichés obtenus par microscopie (optique ou électronique à balayage) permettent de mesurer le diamètre moyen des particules et de repérer les macropores à la surface de certains grains. On peut ainsi comparer la morphologie des particules de MIP selon la nature du solvant porogène et selon le protocole de synthèse [84].

I.4. APPLICATION DES MIPs A L'EXTRACTION SOLIDE-LIQUIDE

Les paragraphes précédents ont tâché de mettre en évidence la spécificité de reconnaissance des MIPs ainsi que les moyens mis en œuvre pour la synthèse et la caractérisation de tels matériaux.

La préparation d'échantillon par extraction solide-liquide a tiré parti de la spécificité des MIPs afin d'extraire des molécules ciblées dans des matrices complexes. Avant d'exposer les résultats obtenus par différentes équipes depuis ces quinze dernières années, les principes de l'extraction solide-liquide seront rappelés.

a) Principe de l'extraction solide-liquide et limites des phases commerciales pour une extraction sélective

a-1) Principe de l'extraction solide-liquide (SPE)

L'extraction solide-liquide d'un échantillon a pour but d'extraire certains composés présents dans des échantillons complexes avant leur analyse par CPL, CPG ou EC. Cette démarche permet de pallier l'absence de sélectivité du système de séparation, ou la faible sensibilité du détecteur dans le cas de solutions diluées [85]. Enfin, l'extraction solide-liquide permet de dépolluer l'échantillon avant son injection, et de préserver le matériel chromatographique.

Les molécules ciblées sont retenues par partage ou par adsorption sur la phase d'extraction et éluées au cours d'une ultime étape. Cette étape d'éluion a été précédée d'un ou plusieurs lavages visant à éliminer les espèces interférentes de la matrice (**Figure I.8**).

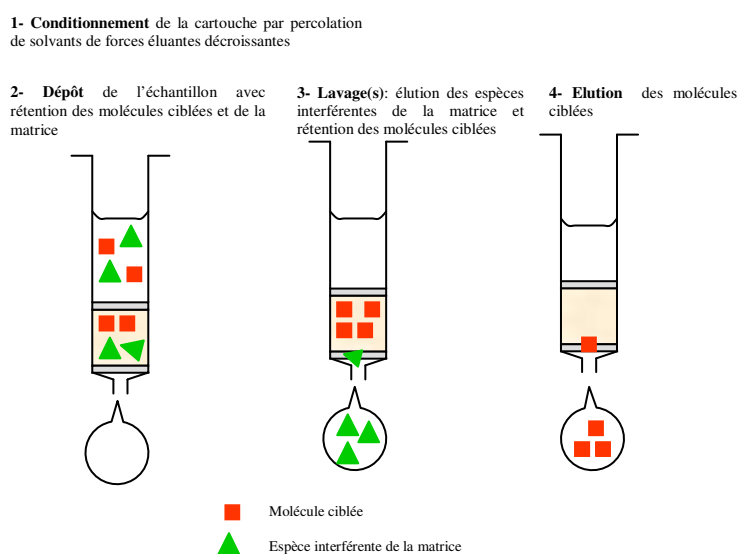


Figure I.8: Protocole général d'une extraction solide-liquide.

α) Formats des supports d'extraction solide-liquide :

Les cartouches dont la forme ressemble à celle d'un corps de seringue sont très fréquemment utilisées et nous ferons usage de ce type de matériel au cours des travaux expérimentaux reportés dans les chapitres suivants. La phase stationnaire (30 – 500 mg) est retenue par deux frittés en polyéthylène de porosité 20 µm dans un réservoir en polypropylène (1 - 12 mL). Les solutions sont percolées à travers la phase stationnaire par gravité ou par aspiration (**Figure I.9**).

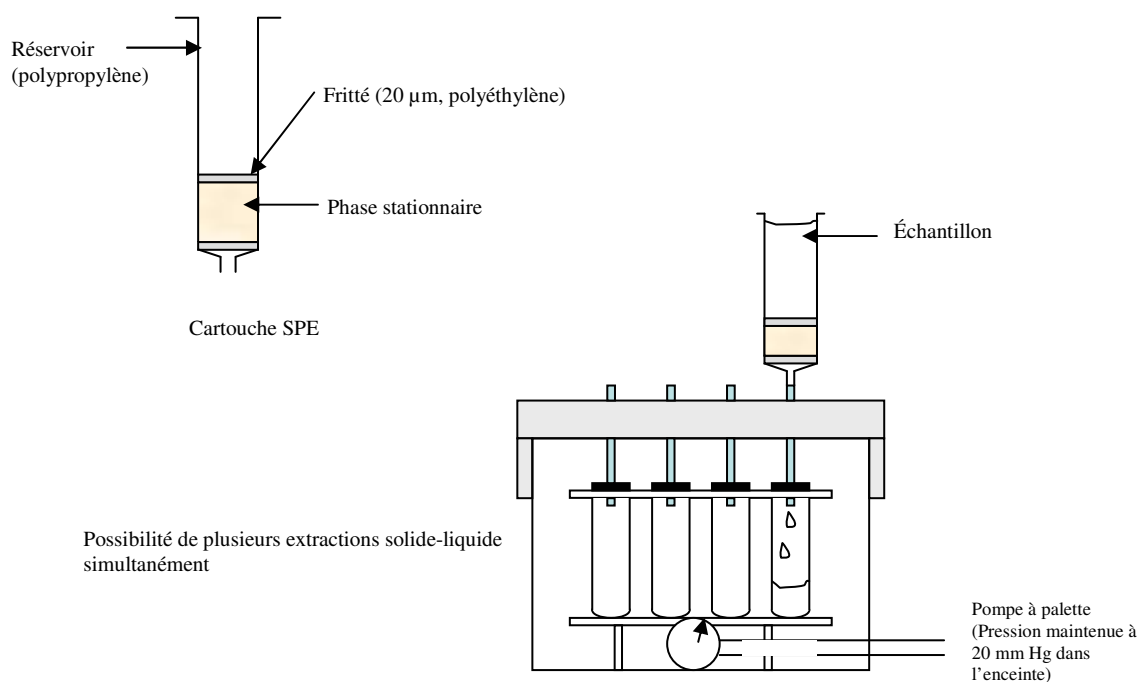


Figure I.9: Montage utilisé pour la préparation d'échantillon par extraction solide-liquide.

Des réservoirs dotés d'embouts de seringue à leurs deux extrémités permettent la percolation des solutions par surpression, avec un débit constant.

Parmi les formats de matériel d'extraction solide-liquide existant actuellement sur le marché, on trouve les disques constitués d'une membrane large et de faible épaisseur sur laquelle de fines particules de phase stationnaire ont été déposées. L'avantage d'un tel support est l'application de débits élevés sans perte de charge notable et sans chemins privilégiés de la phase éluante au travers de la phase stationnaire.

D'autre part, la bioanalyse nécessite de réaliser, de façon automatisée, un grand nombre d'extractions SPE à cadence rapide sur de faibles volumes d'échantillon. Les plateaux à 96 puits, sous forme de cartouches (5 à 10 mg de phase stationnaire) ou de disques, répondent à ces exigences de rapidité et de volume d'échantillon analysé.

Après l'étape d'élution, l'évaporation à sec de la fraction recueillie, contenant les molécules ciblées, est suivie d'une dissolution dans un faible volume de phase mobile avant l'analyse chromatographique. L'échantillon est alors plus concentré et le gain en sensibilité notable.

Dans le cas d'une préparation d'échantillon en ligne (mode "on-line"), la phase stationnaire de la SPE est introduite dans une pré-colonne installée sur une vanne à 6 voies. Le dépôt par percolation de l'échantillon est immédiatement suivi des étapes de lavage. La pré-colonne est ensuite connectée à la colonne analytique et l'élution des solutés est assurée par la phase mobile.

β) Conditions de rétention d'une phase d'extraction :

Le volume d'échantillon déposé sur une cartouche SPE ne doit pas dépasser le volume limite de fixation, noté V_f , sous peine d'éluer une partie des molécules déposées. Plusieurs méthodes telles que la chromatographie frontale ou la chromatographie analytique permettent l'estimation de V_f (**Figure I.10**).

La méthode par chromatographie frontale consiste à percoler à travers une pré-colonne, remplie de phase SPE, une phase mobile dopée en soluté. Le couplage de la pré-colonne à un détecteur spectrophotométrique UV permet alors de suivre la composition de la phase mobile en sortie de la pré-colonne. L'absorbance est nulle tant que le soluté est totalement retenu, puis l'absorbance augmente jusqu'à atteindre une valeur constante A_0 lorsque le soluté n'est plus retenu (A_0 : absorbance du soluté à sa concentration initiale dans la phase mobile). Lorsque l'absorbance (A) atteint 1 % de A_0 , le volume de phase mobile percolée correspond au volume de fin de fixation V_f . Cette méthode est relativement longue et la détermination de V_f est parfois difficile lorsque le saut de la courbe bi-logarithmique $A = f(V)$ est peu intense. Une alternative consiste à déterminer le volume de rétention du soluté (V_r), par injection de ce soluté sur la colonne. La mesure du facteur de rétention k du soluté donne la valeur de V_r :

$$V_r = (1 + k) V_0 \quad [I.8]$$

V_0 est le volume mort de la précolonne.

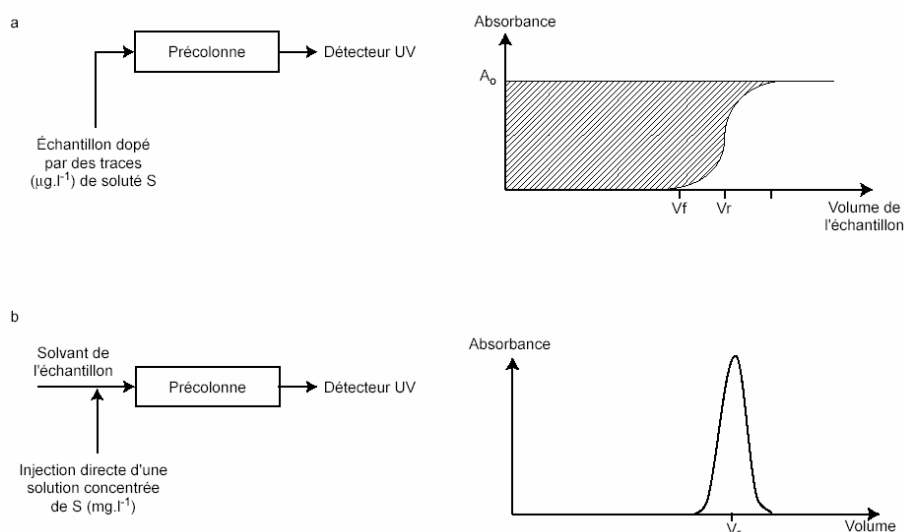


Figure I.10 : Mesure du volume de fin de fixation par chromatographie frontale (a) et du volume de rétention par chromatographie analytique (b) [86].

Une méthode en différé revient à déposer sur une cartouche SPE des volumes croissants d'échantillon dopé en soluté à des concentrations telles que la quantité déposée soit constante. Lors de la percolation d'un volume d'échantillon inférieur à V_f , la rétention du soluté est totale. Pour un volume d'échantillon supérieur à V_f , une partie du soluté est élué par le solvant d'échantillon. Le suivi analytique des fractions recueillies permet d'évaluer V_f .

Le volume de fin de fixation dépend aussi de facteurs cinétiques tels que l'efficacité de la phase d'extraction [87]. La faible quantité de phase stationnaire introduite dans la cartouche ainsi que le diamètre élevé et la taille irrégulière des particules procurent un nombre limité de plateaux théoriques (100 plateaux théoriques estimés en SPE pour 25 000 en CPL). Or V_f diminue avec le nombre de plateaux théoriques selon la relation [I.9].

$$V_f = V_r - 2,3.(V_0/\sqrt{N}).(1 + k_{eau}) \quad [I.9]$$

L'évaluation du volume limite de fixation est réalisée lorsque des volumes importants d'échantillon sont déposés, comme c'est le cas pour la préconcentration de molécules à l'état de traces présentes dans des échantillons environnementaux. Dans les chapitres suivants,

aucune valeur de V_f n'a été déterminée selon les méthodes précédemment décrites. Les protocoles SPE ont été établis à partir de volumes d'échantillon déposés suffisamment faibles.

a-2) Sélectivité d'extraction des phases stationnaires commerciales

La sélectivité d'extraction d'une phase stationnaire en SPE dépend du pouvoir de cette dernière à retenir, jusqu'à l'étape d'élution, la ou les molécules d'intérêt indépendamment des autres constituants de la matrice. Les composés non recherchés sont éliminés au cours des étapes de dépôt et de lavage précédant l'élution.

α) Phase inverse et phase normale :

Les phases inverses ou hydrophobes (ex : Si-C₁₈, PS-DVB (polystyrène – divinylbenzène), PGC (carbone graphitique poreux)) sont très largement utilisées pour l'extraction de molécules de polarité variable contenues dans des matrices aqueuses. L'eau constituant le solvant de ces échantillons favorise la rétention des molécules hydrophobes par le support. Les performances de ces phases varient selon leur surface spécifique (200 – 600 m²/g pour les silices greffées, voire 1000 m²/g pour PS-DVB) et leur hydrophobie. L'hydrophobie des silices greffées dépend de la nature des greffons alkyles (C₈ ou C₁₈) et du taux de greffage. Dans certains cas, la présence de silanols résiduels induit des interactions secondaires favorables à la rétention de solutés basiques. Certains supports polymériques offrent un caractère à la fois hydrophobe et hydrophile (ex : divinylbenzène – N – vinylpyrrolidone) capable de retenir des solutés sur une large gamme de polarité [88]. L'hydrophobie, exprimée sous forme de log P où P est la constante de partage du soluté entre l'octanol et l'eau est couramment utilisée pour évaluer la polarité des molécules recherchées.

Si l'échantillon est constitué de solutés polaires et d'une matrice organique, l'extraction est réalisée sur phase normale (ex : silice, alumine, silice greffée aminopropyle). Les supports à phase normale sont appliqués pour la préparation d'extraits de plantes dissous dans des solvants très apolaires tels que l'hexane, le chloroforme ou le dichlorométhane.

Les phases inverses et normales entraînent la co-extraction de solutés de polarités équivalentes et manifestent ainsi leur manque de sélectivité.

D'autres types de supports tendent vers des extractions sélectives sur des critères d'ionisation, de taille ou de reconnaissance de forme des molécules.

β) Extraction solide-liquide par échange d'ions :

Des supports silice greffée avec des groupements acides (fort : sulfonique ou faible : acide carboxylique) ou basiques (amine) retiennent sélectivement des molécules chargées par interactions ioniques. Ainsi, les molécules ciblées, sous forme ionique, sont retenues au cours du dépôt et des lavages tandis que les espèces neutres ou de charge identique à celle du support sont éluées. In fine, le pH de l'étape d'éluion neutralise les molécules (échangeur fort) ou le support d'extraction (échangeur faible) et rompt ainsi les interactions ioniques responsables de la rétention des molécules. Le pH des différentes phases (dépôt, lavage, éluion) préparées à partir de solutions tampon est fixé en fonction des pK_A des couples acide/base des molécules et des greffons ionisables du support d'extraction. La capacité des phases échangeuses d'ions vis-à-vis des espèces ioniques ou ionisables dépend du nombre de sites échangeur d'ions par unité de masse de phase stationnaire ($\approx 0,85 - 1$ méq/g).

Certaines phases, dites mixtes, mettent en jeu un caractère à la fois phase inverse (silice greffée C_{18} ou C_8 , ou bien polymère HLB) et échangeur d'ions (greffage de groupements benzènesulfonique ou alkyl fonctionnalisé avec un acide carboxylique ou une amine). Ce double caractère de rétention permet de varier la nature des lavages et d'affiner la sélectivité d'extraction.

χ) Extraction solide-liquide sur support à accès restreint :

Les phases à accès restreint (RAM) permettent la rétention des molécules organiques de quelques centaines de Dalton et l'exclusion de molécules à haut poids moléculaire, hydrophiles, telles que les protéines. Les supports à accès restreint les plus fréquemment utilisés sont constitués de grains poreux dont l'intérieur des pores est greffé par des chaînes hydrophobes capables de retenir les molécules organiques de petite taille tandis que la paroi externe des grains est rendue hydrophile par un traitement défavorisant l'adsorption des protéines. Après élimination des protéines lors du dépôt et d'un lavage aqueux, les molécules d'intérêt sont éluées avec un mélange hydro-organique et analysées en ligne par CPL.

Cette méthode n'est applicable que pour des molécules dont les tailles diffèrent de plusieurs centaines de Dalton. Elle n'est pas suffisamment spécifique pour la reconnaissance d'une molécule au sein d'un mélange complexe contenant d'autres composés de taille équivalente.

δ) Extraction solide-liquide par reconnaissance de forme sur immunoadsorbants:

Les immunoadsorbants constitués d'anticorps favorisent la reconnaissance spécifique d'une molécule recherchée.

L'immunoconjugué constitué de la molécule recherchée greffée à une protéine est injecté dans l'organisme d'un mammifère. L'immunisation dure plusieurs semaines au terme desquelles quelques mL de sérum sont prélevés. Les anticorps sont isolés par purification puis fixés sur un support solide d'extraction choisi de telle sorte à diminuer les interactions non spécifiques. La matrice des échantillons extraits par immunoadsorbants étant aqueuse, un support hydrophile (silice activée ou gel d'agarose) limite les interactions non spécifiques de nature hydrophobe. Les immunoadsorbants peuvent être synthétisés à partir d'anticorps polyclonaux dont une faible proportion est spécifique de la molécule recherchée. En revanche, les anticorps monoclonaux, plus chers et obtenus avec un délai plus long que les précédents, apportent une meilleure spécificité.

La capture d'une molécule par un anticorps résulte d'une complémentarité spatiale entre les deux entités, issue de la somme de multiples interactions intermoléculaires. Cependant, un immunoadsorbant peut aussi retenir des molécules de structure similaire à celle de la molécule ciblée ayant servi à la production des anticorps. Cette réactivité croisée (cross-reactivity) est un atout lors de l'extraction d'une molécule et de ses métabolites. Après un lavage aqueux (pH, force ionique et % modificateur organique optimisés pour supprimer les interactions non spécifiques), les molécules retenues spécifiquement, sont désorbées avec un mélange hydro-organique (ACN-H₂O ou MeOH-H₂O). La capacité d'un immunoadsorbant dépend du nombre de sites accessibles ainsi que des énergies mises en jeu par ces sites [86].

Si ces supports tendent à une spécificité de reconnaissance structurale des molécules incontestable, la méthode présente des inconvénients sur le plan délai d'obtention des matériaux, coût et tenue chimique. C'est la raison pour laquelle les polymères à empreintes moléculaires ont été appliqués comme alternative aux immunoadsorbants pour la préparation sélective d'échantillon par extraction solide-liquide.

b) Préparation d'échantillon sur un polymère à empreintes moléculaires

Compte tenu de la spécificité de recapture d'une molécule empreinte ou de molécules analogues par un MIP, son utilisation pour la préparation d'échantillons par extraction solide-liquide présente un intérêt certain dans le cas de matrices chargées. Ainsi, le MIP-terbutylazine montre une sélectivité d'extraction satisfaisante pour trois triazines présentes dans un extrait de sol dopé (**Figure I.11**).

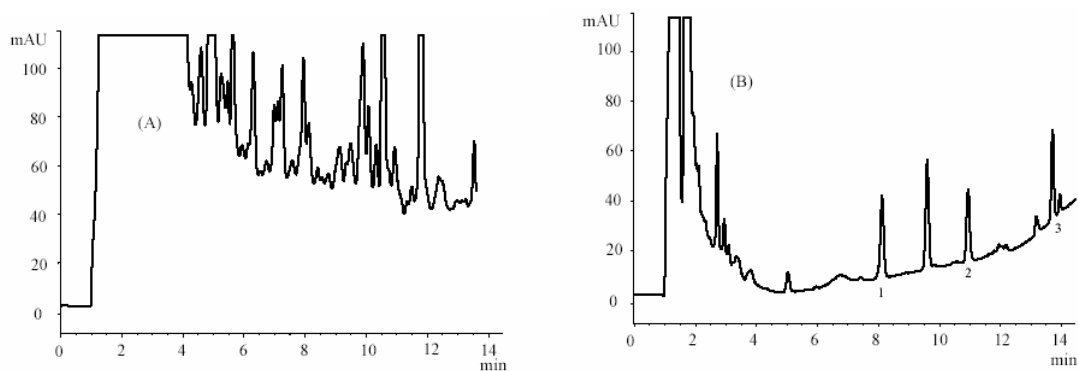


Figure I.11: Chromatogrammes obtenus après l'injection d'un extrait de sol dopé en triazines à 20 ng/g (A) sans et (B) avec extraction sur MIP-terbutylazine. (1) atrazine, (2) simazine (3) terbutylazine [89].

Les précédents paragraphes ont montré que le choix de la molécule empreinte, du (ou des) monomère(s) fonctionnel(s), de l'agent réticulant et du solvant porogène conditionne la formation des sites de reconnaissance du MIP.

Cependant, de la nature des phases percolées dépendent la sélectivité et la capacité du MIP.

b-1) Mise en place d'un protocole SPE-MIP sélectif

Après la synthèse du MIP selon une des voies décrites précédemment, la cartouche d'extraction est remplie avec une masse de polymère comprise entre 30 et 200 mg puis un protocole d'extraction est élaboré.

Au cours de l'extraction solide-liquide d'un échantillon, la sélectivité du MIP est évaluée autour de deux critères [90]:

- Comparaison des résultats apportés par le même protocole appliqué au MIP et au NIP.

La sélectivité d'un protocole SPE est prouvée par un rendement d'extraction de la molécule recherchée supérieur pour le MIP par rapport au NIP. Ainsi, K.Möller montre le gain en sélectivité d'extraction du diphenylphosphate avec l'augmentation de la teneur en méthanol dans l'étape de lavage précédant l'élution [16] (**Figure I.12**).

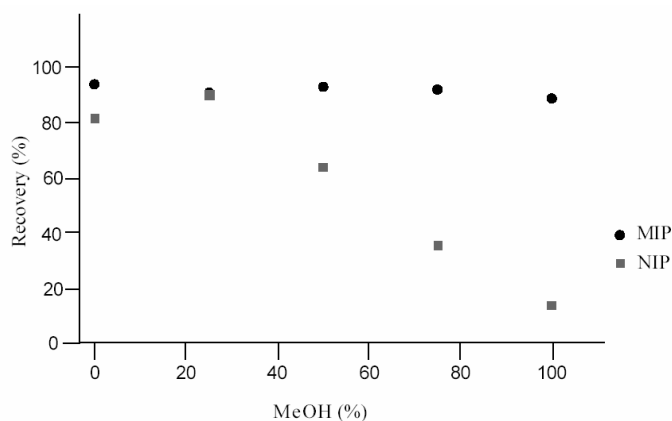


Figure I.12 : Recouvrements à l'éluion du diphenylphosphate extrait par le MIP et le NIP (monomère : 2-VP) après un lavage (1mL) d'ammoniaque 5 mM contenant différents pourcentages en méthanol [16].

- Aptitude du MIP à éliminer la matrice de l'échantillon au cours des lavages.

α) Etape de conditionnement :

Avant de déposer l'échantillon sur le polymère, l'étape de conditionnement a pour but d'éliminer des espèces interférentes potentiellement recouvrées lors de l'étape d'éluion, et de préparer le polymère à recevoir l'échantillon.

β) Etape de dépôt :

Lors du dépôt d'un échantillon sur un MIP, les conditions optimales de reconnaissance des molécules ciblées par les empreintes sont vérifiées dans le solvant porogène. Un autre solvant peut être choisi s'il favorise des interactions fortes entre la molécule recherchée et les groupes fonctionnels situés à l'intérieur de l'empreinte. Les solvants aprotiques (toluène, dichlorométhane, chloroforme, acétonitrile) et peu polaires sont capables d'intensifier les liaisons hydrogène tout en éliminant les interactions hydrophobes non spécifiques. Les molécules ciblées (empreinte ou analogues) sont alors retenues par adsorption sélective (**Figure I.13 (a)**) alors que les molécules dont la conformation n'est pas adaptée à celle des empreintes ne sont retenues que par interactions non spécifiques.

Le dépôt d'un échantillon aqueux (biologique, environnemental) sur le MIP permet la rétention des molécules par des interactions hydrophobes. La rétention est principalement non spécifique et identique à celle obtenue avec un support classique à polarité de phase inversée (**Figure I.13 (b)**).

χ) Etape de lavage :

Dans la majorité des cas, le solvant de lavage doit rompre les interactions non spécifiques (**Figure I.13 (a) et (b)**).

Ainsi, la composition des solutions de lavage est adaptée aux interactions non spécifiques à éliminer. Une solution de lavage peut être un mélange hydro-organique [91] ou un solvant aprotique (acétonitrile) dopé en modificateur polaire et protique tel qu'un alcool [76], un acide ou une base [92] (acide acétique, ammoniac, diéthylamine). Lorsque le mélange de lavage est constitué majoritairement du solvant progène, la reconnaissance des molécules ciblées par les empreintes est favorisée.

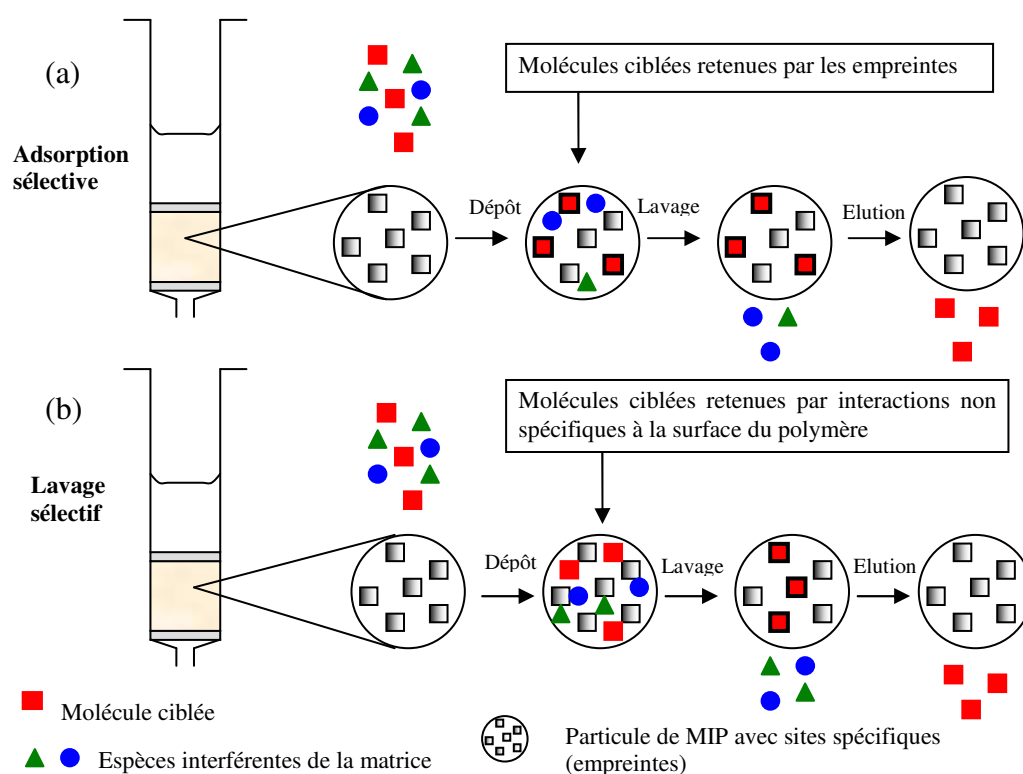


Figure I.13 : Adsorption (a) ou lavage (b) sélectifs obtenus lors de l'extraction solide-liquide sur MIP [33].

Le tableau I.4 reporte les différentes interactions mises en jeu entre les espèces en solution et le polymère ainsi que les solvants compétiteurs. Les caractères prédominants des solvants utilisés dans les étapes de lavage (donneur et/ou accepteur de liaisons hydrogène, interactions dipôle-dipôle selon Rohrschneider, dissociant (ϵ)) sont reportés en annexe I.1.

Interaction	Composition des solutions de lavage
hydrophobe	tout solvant organique
dipôle-dipôle	acétonitrile, dichlorométhane, tétrahydrofurane, chloroforme
liaison hydrogène	chloroforme, méthanol, acétonitrile – acide acétique, eau
ionique	acide (acide acétique) ou base (ammoniac ou diéthylamine) dans un solvant dissociant (acétonitrile ou méthanol)

Tableau I.4 : Nature des solvants compétiteurs.

Cependant, certaines espèces contenues dans la matrice de l'échantillon peuvent inhiber la reconnaissance des molécules ciblées par les empreintes du MIP. C'est notamment le cas lors de l'extraction d'échantillons dotés d'une matrice saline (plasma et urine) ou de macromolécules telles que les protéines ou acides humiques. En effet, les sels apportant des cations (Ca^{2+} , Na^{+}) sont des compétiteurs d'interactions ioniques et de liaisons hydrogène. D'autre part, les protéines et acides humiques peuvent interagir fortement avec les solutés et le polymère, empêchant l'adsorption des solutés par le polymère.

Plusieurs démarches reportées dans la littérature ont été suivies pour limiter les conséquences des espèces interférentes.

L'une d'elles consiste à diluer l'échantillon dans une solution tampon de façon à éliminer les cations minéraux par création de charges positives sur le support polymérique constitué de 2 ou 4-VP [16,93]. Un pH judicieusement choisi peut simultanément intensifier les interactions non covalentes entre le polymère et les molécules ciblées.

Une autre démarche consiste à neutraliser le support polymérique contenant des monomères MAA par un lavage acide fort (HCl) afin d'éliminer les cations minéraux et de libérer les sites de liaisons hydrogène du polymère [94].

Les interactions soluté-protéine peuvent être rompues par ajout d'acétonitrile. Les protéines précipitent et sont éliminées par centrifugation et filtration. L'échantillon est alors déposé

dans une matrice hydro-organique qui diminue les interactions hydrophobes non spécifiques [95].

Enfin, l'ajout d'un détergent (Tween 20) à un échantillon aqueux diminue les interactions non spécifiques hydrophobes possibles à la surface du polymère tout en laissant les sites spécifiques du MIP disponibles [59]. La précipitation des protéines n'est donc pas nécessaire avant le dépôt de l'échantillon sur le MIP.

δ) Étape d'élution :

L'étape d'élution doit permettre d'obtenir un bon recouvrement des molécules recherchées avec un volume de solvant percolé le plus faible possible.

Les MIPs préparés à partir de MAA, AA ou 4-VP peuvent être assimilés à des phases normales en milieu organique ou bien à des résines échangeuses d'ions. Ainsi, l'étape d'élution est efficace en présence d'un solvant organique polaire auquel peuvent être ajoutés de l'eau ou un modificateur de nature acide ou basique (acide acétique ou triéthylamine). L'eau ou un solvant organique suffisamment polaire et protique rompent les liaisons hydrogène tandis que le modificateur entre en compétition avec les monomères fonctionnels [96].

Généralement, le solvant organique favorise la solubilisation des composés organiques. Dans le cas de molécules très hydrophiles, l'eau peut directement être utilisée comme phase éluante [76].

b-2) Capacité du MIP

La capacité d'une cartouche SPE correspond à la quantité maximale d'un composé retenue par un MIP dans des conditions données [89]. Lorsque le protocole d'extraction solide-liquide est établi avec une élimination efficace de la matrice et des rendements élevés, une évaluation de la capacité de la cartouche peut être réalisée sur une solution standard.

Des échantillons dopés à des concentrations croissantes en soluté (molécule recherchée : empreinte ou analogue) sont déposés, à volume constant, sur une cartouche remplie de MIP.

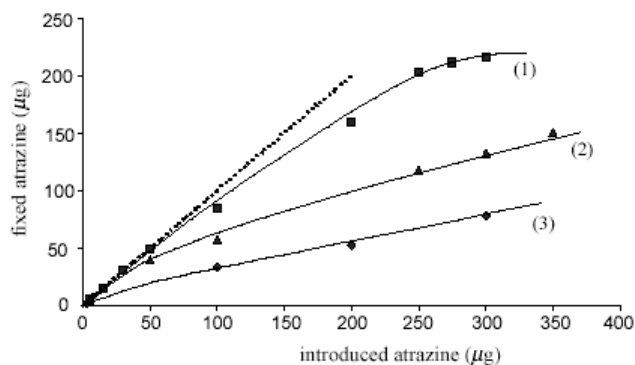


Figure I.14: Courbe de capacité obtenue après la percolation de : (1) 5 mL, (2) 10 mL et (3) 25 mL d'un mélange de CH_2Cl_2 / MeOH 99/1 (v/v) dopé avec des quantités croissantes d'atrazine sur un MIP préparé à partir de terbutylazine (130 mg) [89].

Dans la figure I.14, les courbes sont tracées dans des conditions telles que les interactions non spécifiques sont toutes éliminées lors du dépôt. La quantité extraite à l'éluion (quantité retenue par interactions spécifiques) est reportée en fonction de la quantité déposée.

La partie linéaire reporte des recouvrements de 100 % en atrazine [97], au-delà, le recouvrement diminue. F.Chapuis souligne que la capacité du MIP terbutylazine est en moyenne trente fois supérieure à celle d'un immunoadsorbant.

Lorsque le volume d'échantillon percolé augmente, la quantité d'atrazine retenue diminue. L'auteur interprète ce résultat par le fait que 5 mL d'échantillon entraînent l'interaction de l'atrazine avec un nombre de sites plus élevé que dans le cas d'un volume percolé égal à 10, voire 25 mL. Quand le volume déposé augmente, le volume limite de fixation est plus rapidement atteint pour les sites de faible affinité et la rétention du soluté n'est assurée que par les sites d'énergie élevée. Le plateau de saturation correspond à une saturation de tous les sites spécifiques par l'atrazine.

Il convient de vérifier si la capacité évaluée avec des solutions standards se trouve modifiée en présence d'une matrice réelle. Nous réaliserons une démarche similaire dans le cadre de l'extraction par SPE-MIP de l'acide 18- β -glycyrrhétinique contenu dans la racine de réglisse (chapitre II).

I.5. CONCLUSION

La préparation d'échantillon est une étape limitante du processus analytique. De son efficacité dépend la quantification des molécules ciblées. Les MIPs sont des matériaux faits sur mesure pour des extractions sélectives permettant l'enrichissement d'échantillons complexes et un gain en sensibilité des méthodes d'analyse.

Les travaux publiés à ce jour montrent que la technologie des MIPs repose sur la qualité des empreintes formées. Cette dernière dépend de l'aptitude des monomères, agents réticulants, processus de polymérisation à fournir une population homogène d'empreintes accessibles et d'affinité élevée. Différentes méthodes de modélisation puis de caractérisation aident à l'optimisation des performances d'un MIP.

L'affinité élevée des empreintes pour les molécules ciblées permet la mise en place de lavages efficaces en extraction solide-liquide. L'application des MIPs dans la préparation de fluides biologiques (extraction d'antibiotiques, anti-cancéreux, β -agonistes...), d'extraits de plantes (extraction de molécules actives d'intérêt thérapeutique...) ou d'échantillons environnementaux (extraction de pesticides...) a donné lieu à la mise au point de protocoles adaptés à la nature des matrices.

L'arrivée des MIPs sur le marché des phases d'extraction confirme l'intérêt porté à ces matériaux, moins onéreux et plus simples à synthétiser que les immunoabsorbants (MIP Technologies en Suède, PolyIntell en France) [98].

Les travaux réalisés au cours de cette thèse vont illustrer l'intérêt des MIPs dans l'extraction de composés contenus dans des matrices végétale et biologique. Le chapitre II portera sur l'application des MIPs à l'extraction sélective des triterpènes présents dans des extraits de plantes (collaboration avec les Laboratoires LVMH-Recherche, Saint-Jean-de-Braye, France). Puis, dans le chapitre III, sera développée l'extraction spécifique du tamoxifène et de ses métabolites contenus dans l'urine de sportifs dopés (collaboration avec l'agence française de lutte contre le dopage, Châtenay-Malabry, France).

Références bibliographiques :

- [1] C.Alexander, H.S.Andersson, L.I. Andersson, R.J. Ansell, N. Kirsch, I.A. Nicholls, J. O'Mahony, M.J. Whitcombe. *J.Mol.Recognit.* 19 (2006) 106.
- [2] D.Spivak, M.A.Gilmore, K.J.Shea. *J.Am.Chem.Soc.* 119 (1997) 4388.
- [3] G.Wulff, A.Sarhan, K.Zabrocki. *Tetrahedron Lett.* 4329 (1973).
- [4] K.J.Shea, E.A.Thompson. *J.Org.Chem.* 43 (1978) 4255.
- [5] J.Damen, D.C.Neckers. *J.Org.Chem.* 45 (1980) 1382.
- [6] A.Sarhan, G.Wulff. *Makromol.Chem.* 183 (1982) 85.
- [7] M.Gallego-Gallegos, R.Munoz-Olivas, C.Camara, M.J.Mancheno, M.A.Sierra. *Analyst*, 131 (2006) 98.
- [8] B.Sellergren. *Chirality* 1(1989) 63.
- [9] R.Arshady, K.Mosbach. *Macromol.Chem.Phys.* 182 (1981) 687.
- [10] R.Rosset, M.Caude, A.Jardy, *Chromatographies en phase liquide et supercritique. Masson, Paris, 3^{ème} ed. (1991).*
- [11] D.A.Spivak, K.J.Shea. *Macromolecules* 31(1998) 2160.
- [12] J.Matsui, O.Dobhoff-Dier, T.Takeuchi. *Anal. Chim. Acta* 343(1997) 1.
- [13] H.S. Guo, X.W. He. *J.Anal.Chem.* 368 (2000) 461.
- [14] X.Huang, L.Kong, X.Li, C.Zheng, H.Zhou. *J.Mol.Recogn.* 16 (2003) 406.
- [15] J.Bastide, J.-P.Cambon, F.Breton, S.A.Piletsky, R.Rouillon. *Anal. Chim. Acta* 542 (2005) 97.
- [16] K.Möller, U.Nilsson, C.Crescenzi. *J.Chromatogr.B*, 811(2004) 171.
- [17] T.L.Zhang, F.Liu, W.Chen, J.Wang, K.Li. *Anal.Chim.Acta*, 450 (2001) 53.
- [18] C.Yu, K.Mosbach. *J.Org.Chem.* 62 (1997) 4057.
- [19] J.Xie, L.Zhu, H.Luo, L.Zhou, C.Li, X.Xu. *J.Chromatogr.A* 934 (2001) 1.
- [20] C.Baggiani, P.Baravalle, C.Giovanelli, C.Tozzi. *J.Chromatogr.A* 1117 (2006) 74.
- [21] B.Dirion, Z.Cobb, E.Schillinger, L.I.Andersson, B.Sellergren. *J.Am.Chem.Soc.* 125 (2003) 15101.
- [22] A.Kugimiya, Y.Kuwada, T.Takeuchi. *J.Chromatogr.A* 938 (2001) 131.
- [23] Y.G.Tan, Z.L.Zhou, P.Wang, L.H.Nie, S.Z.Yao. *Talanta* 55 (2001) 337.
- [24] D.Hawkins, D.Stevenson, S.M.Reddy. *Anal.Chim.Acta* 542 (2005) 61.
- [25] A.Kugimiya, H.Takei. *Anal.Chim.Acta* 564 (2006) 179.
- [26] G.Yang, H.Liu, M.Wang, S.Lin, Y.Chen. *React. Funct. Polym.* 66 (2006) 579.

- [27] K.Yano, K.Tanabe, T.Takeuchi, J.Matsui, K.Ikebukuro, I.Karube. *Anal.Chim.Acta* 363 (1998) 111.
- [28] N.Zhong, H.S.Byun, R.Bittman. *Tetrahedron Letters* 42 (2001) 1839.
- [29] E.Yilmaz, K.Mosbach, K.Haupt. *Anal.Commun.* 36 (1999) 167.
- [30] J.U.Klein, M.J.Whitcombe, F.Milholland, E.N.Vulfson. *Angew.Chem.Intl.* 38 (1995) 2057.
- [31] C.C.Hwang, W.C.Lee. *J.Chromatogr.A* 962 (2002) 69.
- [32] E.Caro, N.Masqué, R.M.Marcé, F.Borrull, P.A.G.Cormack, D.C.Sherrington. *J.Chromatogr.A* 963 (2002) 169.
- [33] K.Möller. Doctoral Thesis. *Molecularly Imprinted Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography/Mass Spectrometry for Biological Samples (2006) ISBN 91-7155-234-0.*
- [34] J.F.Wang, P.A.G.Cormack, D.C.Sherrington, E.Khoshdel. *Angew.Chem.Intl.Ed.Engl.* 42 (2003) 5336.
- [35] I.Surugiu, L.Ye, E.Yilmaz, A.Dzgoev, B.Danielsson, K.Mosbach, K.Haupt. *Analyst* 125 (2000) 13.
- [36] L.Y.Z. Zhang, G.X.Cheng, C.Fu. *Reac.Func.Polym.* 56 (2003) 167.
- [37] J.P.Lai, X.Y.Lu, H.F.Ju, X.W.He. *Anal.Chim.Acta* 442 (2001) 105.
- [38] J.Hantash, A.Barlett, P.Oldfield, G.Dénès, R.O'Rielly, D.Roudiere, S.Menduni. *J.Chromatogr.A* 1125 (2006) 104.
- [39] H.Kempe, M.Kempe. *Anal.Chem.* 78 (2006) 3659.
- [40] J.Haginaka, H.Takehira, K.Hosoya, N.Tanaka. *J.Chromatogr.A* 849 (1999) 331.
- [41] E.Yilmaz, K.Haupt, K.Mosbach. *Angew.Chem.Intl.Ed.Engl.* 39 (2000) 2115.
- [42] Y.Zhang, A.Tong, L.Li. *Spectrochim. Acta Part A* 60 (2004) 241.
- [43] J.Matsui, I.A.Nicholls, T.Takeuchi. *Anal.Chim.Acta* 365 (1998) 89.
- [44] M.Zhang, J.Xie, Q.Zhou, G.Chen, Z.Lin. *J.Chromatogr.A* 984 (2003) 173.
- [45] Y.Lu, C.Li, X.Liu, W.Huang. *J.Chromatogr.A* 950 (2002) 89.
- [46] S-H Cheong, A.E.Rachkov, J-K.Park, K.Yano, I.Karube. *J.Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry* 36 (1998) 1725.
- [47] I.Idziak, A.Benrebouth, F.Deschamp. *Anal.Chim.Acta* 435 (2001) 137.
- [48] K.Farrington, E.Magner, F.Regan. *Anal.Chim.Acta* 566 (2006) 60.
- [49] J.Svenson, J.G.Karlsson, I.A.Nicholls. *J.Chromatogr.A* 1024 (2004) 39.
- [50] S.A.Piletsky, K.Karim, E.U.Piletska, C.J.Day, K.W.Freebairn. *Analyst* 126 (2001) 1826.
- [51] D.Pavel, J.Lagowski. *Polymer* 46 (2005) 7528.

- [52] S.Piletsky, E.Piletska, K.Karim, G.Foster, C.Legge, A.Turner. *Anal.Chim.Acta* 504 (2004) 123.
- [53] K.Karim, F.Breton, R.Rouillon, E.V.Piletska, A.Guerreiro, I.Chianella, S.A.Piletsky. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57 (2005) 1795.
- [54] P.A.G.Cormack, K.Mosbach. *React.Funct. Polym.* 41 (1999) 115.
- [55] P.D.Martin, G.R.Jones, F.Stringer, I.D.Wilson. *J. Pharm.Biomed.Anal.* 35 (2004) 1231.
- [56] B.A. Rashid, R.J. Briggs, J.N. Hay, D. Stevenson. *Anal. Commun.* 34 (1997) 303.
- [57] J.L.Urraca, M.D.Marazuela, E.R.Merino, G.Orellana, M.C.Moreno-Bondi. *J.Chromatogr.A* 1116 (2004) 127.
- [58] A.Ellwanger, C.Berggren, S.Bayoudh, C.Crecenzi, L.Karlsson, P.K.Owens, P.Cormack, D.Sherrington, B.Sellergren. *Analyst* 126 (2001) 784.
- [59] L.I.Andersson, E.Handenborg, M.Sandberg-Stall, K.Möller, J.Henriksson, I.Brambsy-Sjöström, L.I.Olsson, M.Abdel-Rehin. *Anal.Chim.Acta* 526 (2004) 147.
- [60] J.Wang, R.Guo, J.Chen, Q.Zhang, X.Liang. *Anal.Chim.Acta* 540 (2005) 307.
- [61] E.Turiel, A.Martin-Esteban, P.Fernandez, C.Pérez-Code, C.Camara. *Anal.Chem.* 73 (2001) 5133.
- [62] M.Kawaguchi, Y.Hayatsu, H.Nakata, Y.Ishii, R.Ito, K.Saito, H.Nakazawa. *Anal.Chim.Acta* 539 (2005) 83.
- [63] B.Sellergren, K.J.Shea. *J.Chromatogr.* 635 (1993) 31.
- [64] M.Nomachi, T.Kubo, K.Hosoya, K.Kaya. *Anal.Bioanal.Chem.* 384 (2006) 1291.
- [65] M.T.Muldoon, L.H.Stanker. *Anal.Chem.* 69 (1997) 803.
- [66] K.Yoshizako, K.Hosoya, Y.Iwakoshi, K.Kimata, N.Tanaka. *Anal.Chem.* 70 (1998) 386.
- [67] E.Caro, R.M.Marcé, P.A.G. Cormack, D.C.Sherrington, F.Borrull. *Anal.Chim.Acta* 562 (2006) 145.
- [68] M.Fiori, C.Civitareale, S.Mirante, E.Magard, G.Brambilla. *Anal.Chim.Acta* 529 (2005) 207.
- [69] P.A.G.Cormack, A.Z.Elorza. *J.Chromatogr.B* 804 (2004) 173.
- [70] M.Kempe, K.Mosbach. *Tetrahedron Letters* 36 (1995) 3563.
- [71] J.Xie, L.Chen, C.Li, X.Xu. *J.Chromatogr.B* 788 (2003) 233.
- [72] R.Suedee, V.Seechamnaturakit, B.Canyuk, C.Ovatlarnporn, G.P.Martin. *J.Chromatogr.A* 1114 (2006) 239.
- [73] M.Sibrian-Vazquez, D.A.Spivak. *J.Am.Chem.Soc.* 126 (2004) 7827.
- [74] C.Yu, K.Mosbach. *J.Chromatogr.A* 888 (2000) 63.
- [75] Y.Lu, C.Li, X.Wang, P.Sun, X.Xing. *J.Chromatogr.B* 804 (2004) 53.

- [76] S.Le Moullec, A.Bégos, V.Pichon, B.Bellier. *J.Chromatogr.A* 1108 (2006) 7.
- [77] H.Kim, K.Kaczmarek, G.Guiochon. *J.Chromatogr.A* 1101 (2006) 136.
- [78] Q-Z.Zhu, K.Haupt, D.Knopp, R.Niessner. *Anal. Chim. Acta* 468 (2002) 217.
- [79] D.A.Spivak. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 58 (2006) 116.
- [80] D.A.Spivak. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57(2005) 1779.
- [81] R.I.Umpleby II, S.C.Baxter, A.M.Rampey, G.T.Rushton, Y.Chen, K.D.Shimizu. *J.Chromatogr. B* 804 (2004) 141.
- [82] R.J.Umpleby, M.Bode, K.D.Shimizu. *Analyst* 125 (2000) 1261.
- [83] G.Yang, D.Wang, Z.Li, S.Zhou, Y.Chen. *Chromatographia* 58 (2003) 53.
- [84] G.P.Gonzalez, P.F.Henando, J.S.Durand Alegria. *Anal.Chim.Acta* 557 (2006) 179.
- [85] J.Pawliszyn. *Sampling and Sample Preparation for Field and Laboratory Fundamentals and New Directions in Sample Preparation* (2002).
- [86] F.Chapuis, V.Pichon, M.-C.Hennion. *Oil & Gas Science and Technology – Rev.IFP* 60 (2005) 899.
- [87] V.Pichon. *Techniques de l'ingénieur, Extraction sur phase solide pour l'analyse de composés organiques* (2006).
- [88] N.Fontanals, R.M.Marcé, F.Borrull. *Trends in Analytical Chemistry* 24 (2005) 394.
- [89] F.Chapuis, V.Pichon, F.Lanza, B.Sellergren, M.-C.Hennion. *J.Chromatogr.B* 804 (2004) 93.
- [90] V.Pichon, K.Haupt. *J.Liq. Chromatogr. Rel. Techn.* 29 (2006) 989.
- [91] S-G.Hu, S-W.Wang, X-W.He. *Analyst* 128 (2003) 1485.
- [92] G.Theodoridis, P.Manesiotis. *J.Chromatogr.A* 948 (2002) 163.
- [93] E.Caro, R.M.Marcé, P.A.G.Cormack, D.C.Sherrington, F.Borrull. *J.Chromatogr.B* 813 (2004) 137.
- [94] F.Chapuis, V.Pichon, F.Lanza, S.Sellergren, M.-C.Hennion. *J.Chromatogr.A* 999 (2003) 23.
- [95] F.Chapuis, J-U.Mullot, V.Pichon, G.Tuffal, M.-C.Hennion. *J.Chromatogr.A* 1135 (2006) 127.
- [96] E.Caro, R.M.Marcé, F.Borrull, P.A.G.Cormack, D.C.Sherrington. *Trends in Analytical Chemistry* 25 (2006) 143.
- [97] F.Chapuis, V.Pichon, M.-C.Hennion. *LC-GC Europe* 17 (2004) 408.
- [98] C.Widstrand, E.Yilmaz, B.Boyd, A.Rees. www.coumn.eu.com (2006) p.20.

Chapitre II

Application des MIPs au clean-up d'un échantillon organique :
cas des extraits de plantes

II.1) ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE DE L'ANALYSE DES TRITERPENES

Dans cette première partie visant à reporter les travaux publiés concernant l'analyse des triterpènes, quelques résultats obtenus au laboratoire seront présentés (préparation d'échantillon, analyse CPG-SM, analyse CPL-UV).

II.1.1. Rôle des triterpènes dans les plantes

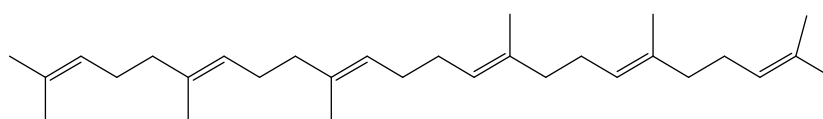
Les plantes produisent de nombreuses molécules réparties au sein de deux groupes distincts que constituent les métabolites primaires et les métabolites secondaires. Si les métabolites primaires (protéines, phospholipides...) sont synthétisés par l'organisme végétal pour assurer des rôles structurels, les métabolites secondaires assurent de nombreuses fonctions biologiques « secondaires » telles que les odeurs, les couleurs ou les mécanismes de défense de la plante.

Les métabolites secondaires ne sont pas issus de la photosynthèse mais de réactions chimiques ultérieures. Deux grands groupes de métabolites secondaires se distinguent : les composés phénoliques et les composés azotés. Les composés phénoliques interviennent dans les interactions plante-plante telles que l'inhibition de germination et de croissance. Parmi ces composés, on trouve la lignine, les flavonoïdes, les anthocyanes. Les composés azotés tels que les alcaloïdes ont un rôle défensif vis-à-vis d'agressions extérieures entraînant des lésions pour la plante. La nicotine, la codéine et la lupinine appartiennent à cette famille.

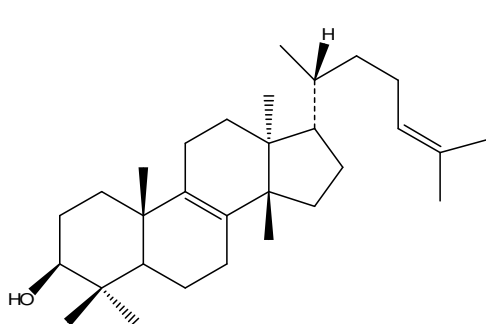
Les résultats expérimentaux présentés dans la suite de ce chapitre porteront sur l'extraction et l'analyse de molécules appartenant à la famille des triterpènes, métabolites secondaires n'appartenant pas aux deux groupes précédemment énoncés.

Beaucoup de triterpènes se trouvent dans les plantes sous forme glycosylée, c'est-à-dire couplés au niveau des atomes d'oxygène de la fonction alcool ou acide à un ou plusieurs sucres (ex: hexose, pentose, acide glucuronique). Ces molécules sont appelées saponines et sont dotées d'une polarité supérieure à celle de leur forme aglycone. Il existe trois types de composés triterpéniques. Les composés aliphatiques comme le squalène sont présents dans les huiles végétales telles que les huiles d'olive et de lin. L'euphol est un exemple de dérivés tétracycliques retrouvé dans les résines d'*Euphorbia resinifera*. Enfin, les composés pentacycliques sont présents en grand nombre dans le règne végétal. Parmi ces composés, on trouve les α - et β -amyrines présentes dans les résines (Elémi de Manille, Okoumé), l'acide oléanolique (olivier, aubépine), l'acide glycyrrhétinique (sous forme glucuronique dans la

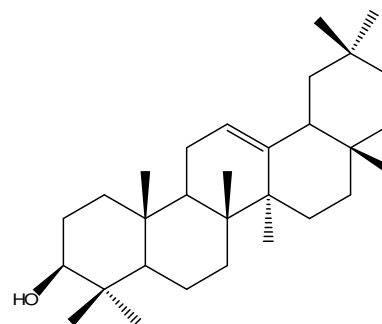
glycyrrhizine de la réglisse), l'hédéragénine (lierre), la bétuline (écorce de bouleau). Les structures de ces différentes molécules sont reportées dans la figure II.1.



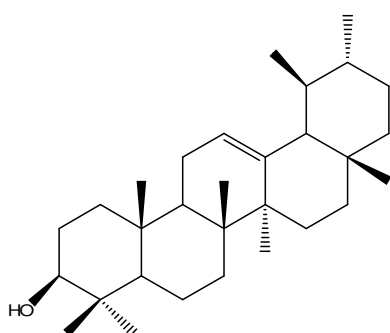
squalène



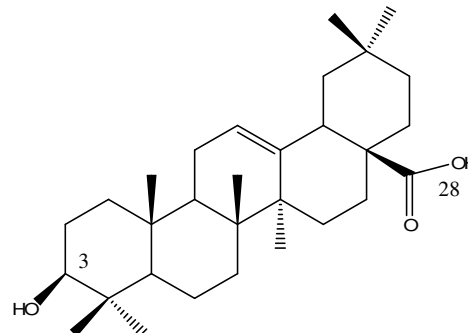
euphol



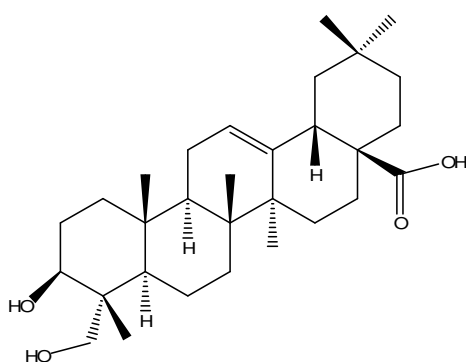
β -amyrine



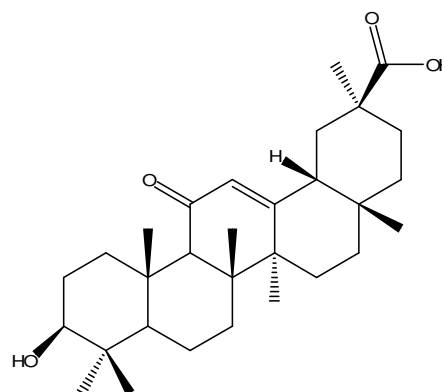
α -amyrine



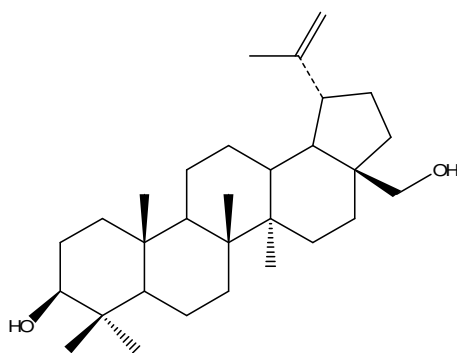
acide oléanolique



hédéragénine



acide 18- β -glycyrrhétinique



bétuline

Figure II.1 : Structures de quelques triterpènes présents dans le règne végétal.

L'annexe II fournit une liste de métabolites secondaires avec leur répartition dans les différentes parties de la plante [1].

II.1.2. Méthodes d'analyse des triterpènes

a) Chromatographie sur couche mince (CCM)

La CCM permet l'identification des familles de molécules contenues dans un extrait de plante. Elle présente un certain nombre d'avantages tels que l'analyse simultanée de plusieurs échantillons, la mise en évidence de tous les composés présents dans l'échantillon, indépendamment de leur élution, et une préparation d'échantillon minimale. La CCM réunit ainsi des conditions favorables au screening de plantes à débit élevé. Cependant, cette technique est parfois critiquée pour sa faible reproductibilité et sa précision insuffisante.

Toutefois, l'HPTLC apporte des résolutions très satisfaisantes favorisant ainsi l'analyse de mélanges complexes.

Ainsi, D.Baricevic présente l'analyse par CCM des acides ursolique et oléanolique présents dans les feuilles de *Salvia Officinalis*. Ces triterpènes ont été identifiés par CCM grâce à la révélation à l'anisaldéhyde en présence d'acide sulfurique. Après dérivation, l'acide ursolique donne une fluorescence de couleur jaune alors que la fluorescence de l'acide oléanolique est bleue, à 366 nm. Puis, l'acide ursolique, après une nouvelle réaction de dérivation à l'acide molybdophosphorique, a été quantifié par absorption dans le visible (mesure densitométrique à 560 nm, Camag TLC Scanner, Suisse) [2].

La démarche appliquée à l'extrait de *Salvia Officinalis* est proche de celle suivie par le laboratoire LVMH Recherche Produits Actifs, pour la recherche des triterpènes sous formes aglycones (sans unité sucre) et hétérosidiques retrouvés dans des extraits de plantes (Annexe III).

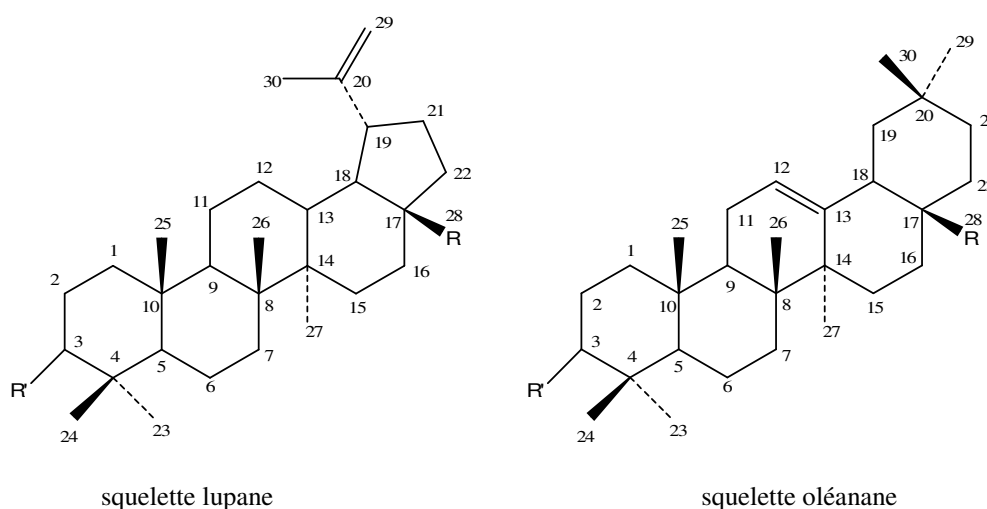
Enfin, la CCM préparative permet de récupérer des quantités suffisantes de chaque grande famille de composés en vue d'analyses structurales par RMN (^1H et ^{13}C) ou spectrométrie de masse.

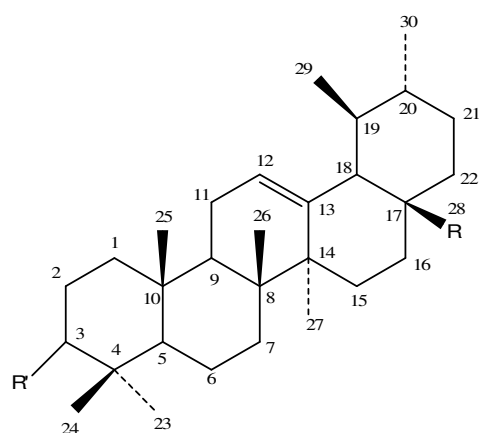
b) Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse en impact électronique

b-1) Etude bibliographique de l'analyse des triterpènes pentacycliques par CPG-SM

La CPG est appréciée pour sa rapidité, sa reproductibilité ainsi que pour l'efficacité des colonnes capillaires, capables d'assurer des résolutions satisfaisantes au cours d'analyses de matrices complexes telles que celles des extraits végétaux. Les triterpènes sont des molécules peu adaptées à la CPG car peu volatiles (M_w supérieure à 300 Da et présence de groupes fonctionnels polaires: alcools ou acides). Ainsi, ces molécules sont le plus souvent triméthylsilylées avant leur analyse en CPG.

La recherche de molécules actives dans des extraits de plantes est largement couverte par la CPG-SM (Annexe VII) comme le prouvent les nombreux travaux publiés notamment dans le domaine du screening des plantes médicinales [3-4]. Dans un autre secteur d'investigations, l'analyse d'extraits de résines (*frankincense*) issus de fouilles archéologiques a permis l'identification de 15 triterpènes pentacycliques [5]. Cette famille est composée des lupanes, oléananes et ursanes (**Figure II.2**).





squelette ursane

Figure II.2: Squelettes des triterpènes pentacycliques des familles lupanes, oléananes et ursanes.

Les conditions d'analyse des extraits de résines (*frankincense*) sont reportées dans le tableau II.1. Certains triterpènes étant naturellement sous forme d'ester méthylique, la triméthylsilylation est préférée à la méthylation. De plus, la triméthylsilylation donne des rendements satisfaisants avec les fonctions alcool et acide, fréquemment retrouvées au sein des structures triterpéniques.

Une démarche similaire a été suivie pour l'identification de triterpènes caractéristiques de l'écorce de bouleau, dérivés lupanes [6], ainsi que pour la caractérisation de résines issues de vernis trouvés sur les peintures anciennes [7] (**Tableau II.1**). Dans les trois articles cités, la présence d'acides gras dans les extraits analysés a toujours été mise en évidence. L'hydrophobie équivalente des acides gras et des triterpènes rend leur séparation difficile, particulièrement en absence de préparation d'échantillon spécifique.

D'autres études d'identification d'alcools triterpéniques, notamment dans les fleurs, ont été réalisées par CPG-SM en mode impact électronique, après acétylation [8]. Le lupéol, les α - et β -amyrines et le cycloarténol ont ainsi été retrouvés dans certains extraits.

Enfin des préparations commerciales à base de ginseng contenant de l'acide oléanolique sous forme glycosylée (saponine: ginsenoside R_o) ont été analysées par CPG-FID et CPG-SM. Les analyses ont eu lieu après hydrolyse des échantillons et dérivation de la forme aglycone. La spectrométrie de masse a permis l'identification et le détecteur FID la quantification des composés triterpéniques [9].

Réf.	Echantillon	Conditions chromatographiques	Molécules identifiées
[5]	<i>Frankincense</i> - résine <i>Boswellia</i> (fouilles archéologiques)	<p>- Dérivation : triméthylsilylation avec pyridine, HMDS (Hexaméthylidisilazane), TMS (triméthylchlorosilane).</p> <p>- CPG : Varian Saturn 3900, colonne : poly (5% phényl, 95% diméthylsiloxane) 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, CP-Sil 8 CB low bleed / MS (Varian), gradient de température (50°C – 250°C – 350°C), gaz vecteur: hélium, Vol._{inj.} = 1 µL, split ratio = 1/20, T_{inj.} = 250°C.</p> <p>- SM : Varian 2100 T ion trap, mode impact électronique E_{électron} = 70 eV, gamme m/z : 40 – 650, T_{ligne de transfert} = 300°C, T_{ion trap} = 200°C, T_{manifold} = 50°C.</p>	<p><u>Triterpènes</u> : oléananes, ursanes, lupanes.</p> <p>Identification par interprétation des spectres de masse des dérivés de l'acide boswellique ainsi que de l'α- et β-amyrine.</p>
[6]	Ecorce de bouleau (fouilles archéologiques)	<p>- Dérivation : triméthylsilylation avec CH₂Cl₂, BSTFA (N,O-bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide), TMS (triméthylchlorosilane).</p> <p>- CPG : Varian 9611, colonne : poly (5% phényl, 95% diméthylsiloxane) 25 m x 0,25 mm x 0,25 µm, CP-Sil 8 CB (Chrompack), gradient de température (60°C – 150°C – 310°C), gaz vecteur: hélium, Vol._{inj.} = 2 µL, T_{inj.} = 300°C.</p> <p>- SM : Finnigan TSQ 46, mode impact électronique E_{électron} = 70 eV, gamme m/z : 50 – 650, T_{interface} = 325°C, T_{SM} = 190°C.</p>	<p><u>Triterpènes</u> : lupanes.</p> <p>Identification par interprétation des spectres de masse de la bétuline, du lupéol, du lupénone et autres lupanes présents dans l'écorce de bouleau.</p>
[7]	Vernis constitués de résines "dammar" et "mastic"	<p>- Dérivation : triméthylsilylation avec MTBSTFA (méthyl-t-butyl-silyltrifluoroacétamide) 2% t-butyl diméthylchlorosilane.</p> <p>- CPG : 5890 – Series II (HP), colonne : poly (5% phényl, 95% diméthylsiloxane) 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, HP-5MS et pré-colonne en silice fondue désactivée (2 m), injection on-column, gradient de température (80°C – 200°C – 280°C), gaz vecteur: hélium.</p> <p>- SM : Quadripôle 5971 A (HP), mode impact électronique E_{électron} = 70 eV, gamme m/z : 50 – 650, T_{interface} = 280°C, T_{ion source} = 180°C.</p>	<p><u>Acides triterpéniques</u> : identification des acides oléanonique, ursonique et moronique ainsi que l'α- et β-amyrone.</p>

Tableau II.1 : Exemples d'application de la CPG-SM à l'identification des triterpènes présents dans des extraits de plantes.

Il faut aussi mentionner la séparation par chromatographie capillaire à fluide supercritique avec détecteur à ionisation de flamme de quatre acides triterpéniques pentacycliques (bétulinique, oléanolique, polpunonique et ursolique) [10]. Les avantages de cette méthode par rapport à la CPG sont l'analyse directe, sans dérivation, des acides triterpéniques et une faible durée d'analyse (15 min au lieu de 45-60 min en CPG). L'efficacité des pics est élevée et les résolutions sont très satisfaisantes.

b-2) Analyse d'un extrait d'écorces de platane par CPG-SM

L'écorce de platane contient plusieurs composés triterpéniques pentacycliques dont l'acide bétulinique à une teneur équivalente à 3,3 % en masse [11]. Nous avons mis en place, au laboratoire LVMH Recherche Produits Actifs, une procédure d'analyse par CPG-SM en mode impact électronique permettant d'identifier les dérivés triterpéniques présents dans un extrait méthanolique d'écorce de platane. La séparation a été réalisée avec une colonne capillaire *RTX 65 PG* (poly (65% phényl, 35% diméthyl) siloxane) préconisée pour l'analyse de molécules lourdes et peu polaires (triglycérides). Une programmation de température a été optimisée sur un mélange de 17 triterpènes, standards commerciaux, appartenant aux familles lupane, ursane et oléanane. Les conditions de dérivation par triméthylsilylation sont reportées en annexe VIII. Le chromatogramme issu de l'analyse du mélange standard est présenté dans la figure II.3.

Intensité relative (%)

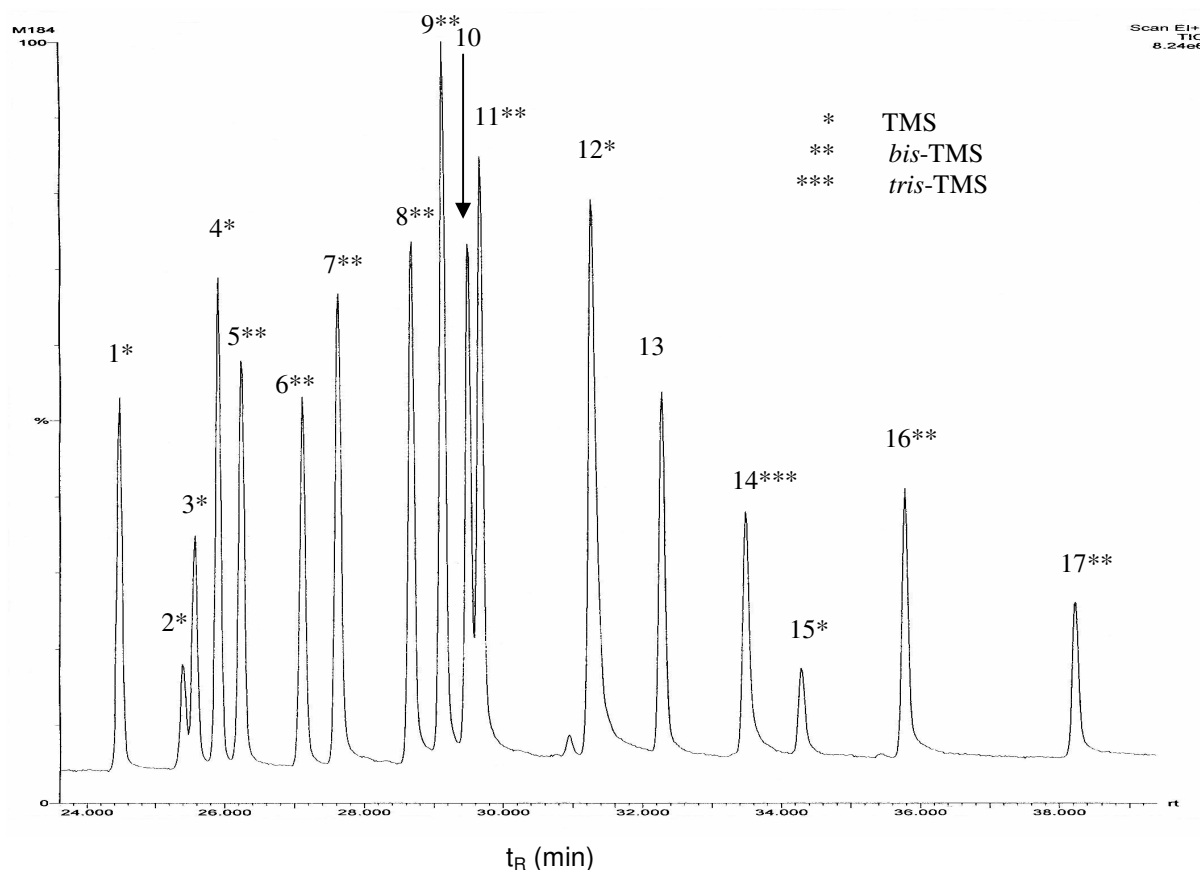
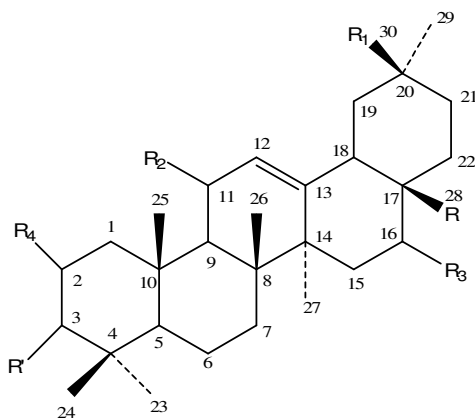


Figure II.3 : Analyse d'un mélange standard de 17 triterpènes pentacycliques par CPG-SM en impact électronique.

Colonne : *RTX 65 PG* (poly (65% phenyl, 35% dimethyl) siloxane) 30 m x 0,32 mm x 0,10 μ m. Gaz vecteur : hélium, débit 2,5 L/min. Programmation de température : 80°C (1 min) – 200°C (1 min) à 20°C/min puis 200°C – 320°C (3 min) à 3°C/min. Spectromètre de masse triple quadripôle, énergie d'ionisation : 70 eV.

Les noms et les caractéristiques structurales et fonctionnelles des triterpènes analysés sont reportés dans le tableau II.2. Les positions des groupes R et R' des squelettes ursane et lupane sont données dans la figure II.2. Celles de groupes R, R', R₁, R₂, R₃ et R₄ du squelette oléanane figurent ci-dessous.



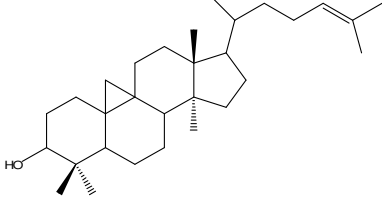
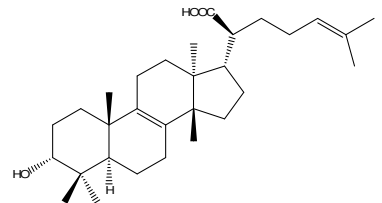
n° pic	Nom des triterpènes	Famille	Nature des substituants			
			R	R'	R ₁	R ₂
1	β-amyrine	oléanane	CH ₃	α-H, β-OH	CH ₃	H
2	α-amyrine	ursane	CH ₃	α-H, β-OH	-	-
3	cycloarténol	triterpène tétracyclique				
4	lupéol	lupane	CH ₃	α-H, β-OH	-	-
5	érythrodiol	oléanane	CH ₂ OH	α-H, β-OH	CH ₃	H
6	uvaol	ursane	CH ₂ OH	α-H, β-OH	-	-
7	bétuline	lupane	CH ₂ OH	α-H, β-OH	-	-
8	acide oléanolique	oléanane	COOH	α-H, β-OH	CH ₃	H
9	acide bétulinique	lupane	COOH	α-H, β-OH	-	-
10	lupénone	lupane	CH ₃	O	-	-
11	acide ursolique	ursane	COOH	α-H, β-OH	-	-
12	acide β-élémonique	triterpène tétracyclique				
13	friédeline	oléanane	CH ₃	O	CH ₃	H
14	acide échinocystique	oléanane	COOH	OH	CH ₃	H (R ₃ = OH)
15	3-α-hydroxy-friédelan-2-one	oléanane	CH ₃	α-OH (R ₄ = O)	CH ₃	H
16	acide β-glycyrrhétinique	oléanane	CH ₃	α-H, β-OH	COOH	O
17	acide α-glycyrrhétinique (épimère (C ₁₈) de l'acide β-glycyrrhétinique)	oléanane	CH ₃	α-H, β-OH	COOH	O

Tableau II.2 : Nom et structure des triterpènes pentacycliques analysés en CPG-SM. R₃ et R₄ = H pour tous les dérivés oléananes hormis l'acide échinocystique et la 3-α-hydroxyfriédelan-2-one.

Ces molécules sont des standards commerciaux fournis par Extra Synthèse (Lyon). Les temps de rétention et les spectres de masse relatifs à chaque pic ont permis l'identification des composés triterpéniques pentacycliques contenus dans un extrait d'écorces de platane. Cet échantillon a été analysé par CPG-SM (**Figure II.4**) après extraction solide-liquide sur phase Si-C₁₈ (Annexe VIII, §.2.a) suivie d'une triméthylsilylation. Les conditions chromatographiques sont identiques à celles appliquées précédemment au mélange standard.

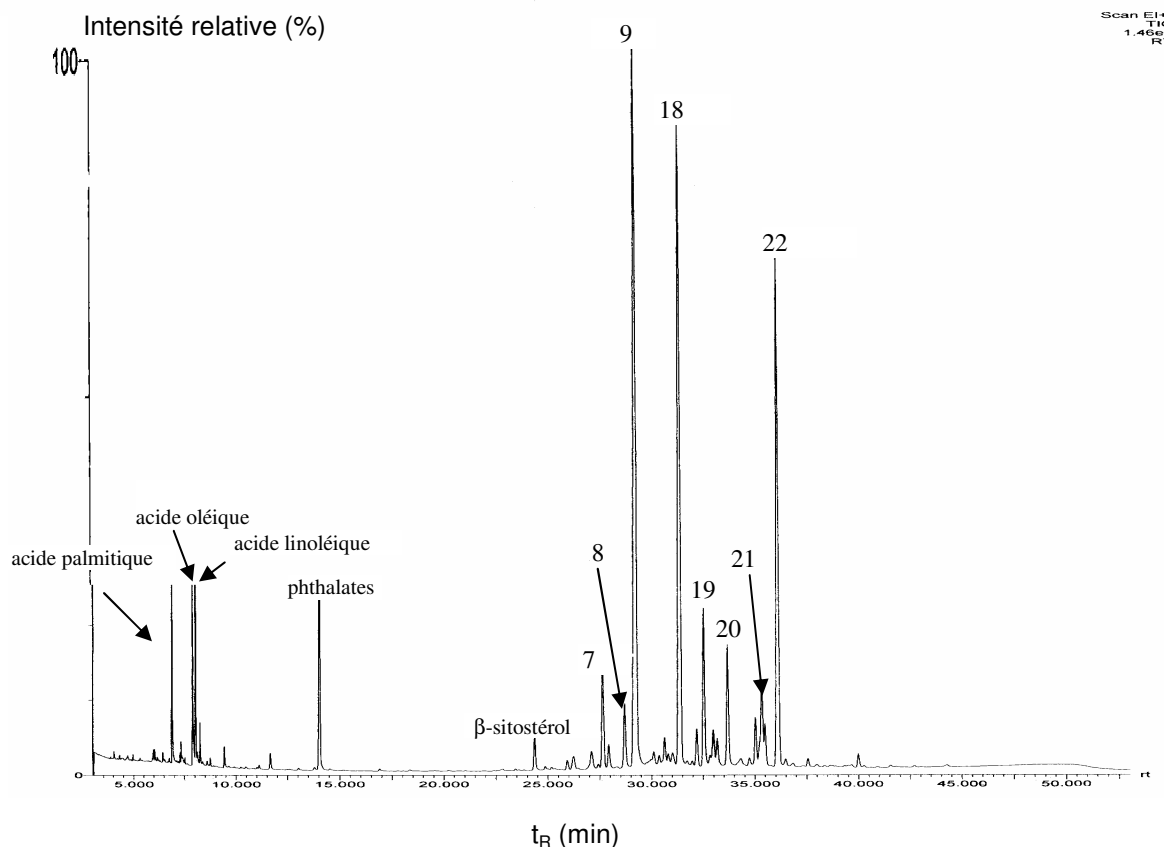


Figure II.4: Analyse d'un extrait méthanolique d'écorces de platane par CPG-SM en impact électronique après SPE sur silice greffée C₁₈.

A l'aide des résultats obtenus avec le mélange standard, les pics 7, 8 et 9 sont identifiés comme étant respectivement la bétuline, l'acide oléanolique et l'acide bétulinique. L'acide bétulinique (pic n° 9) est un des constituants majoritaires de l'extrait méthanolique de l'écorce de platane [11]. Cinq autres triterpènes pentacycliques (pics 18 à 22) ont été identifiés par interprétation des spectres de masse. Le tableau II.3 reporte les principaux fragments obtenus en impact électronique pour les huit triterpènes pentacycliques (pics 7 à 9, 18 à 22) présents dans l'écorce de platane.

n° pic	M ⁺	m/z (intensité relative, %) des principaux fragments
7	586 ^b	73(100), 189(40), 203(24), 496(1)[M-TMSOH], 571(1)[M-CH ₃]
8	600 ^b	73(100), 189(36), 203(83), 482(3)[M-TMSOH-CO], 585(1)[M-CH ₃]
9	600 ^b	73(92), 189(100), 203(35), 482(2)[M-TMSOH-CO], 510(1)[M-TMSOH], 585(1)[M-CH ₃]
18	512 ^a	73(100), 189(92), 203(24), 422(1)[M-TMSOH], 483(1)[M-CHO], 497(1)[M-CH ₃]
19	526 ^a	73(100), 189(43), 203(14), 408(1)[M-TMSOH-CO], 511(1)[M-CH ₃]
20	570 ^a	73(100), 189(50), 203(15), 452(1)[M-TMSOH-CO], 510(1)[M-AcOH], 555(1)[M-CH ₃]
21	482	189(52), 203(100), 422(1)[M-AcOH], 453(1)[M-CHO]
22	482	81(100), 189(88), 203(25), 422(2)[M-AcOH], 453(1)[M-CHO], 467(1)[M-CH ₃]

Tableau II.3: Ion moléculaire M⁺ (m/z) et principaux fragments des spectres de masse des triterpènes pentacycliques présents dans un extrait méthanolique d'écorces de platane, analysé par CPG-SM en impact électronique après silylation (a: mono-triméthylsilylé, b: bis-triméthylsilylé).

Après étude des spectres de masse, sont identifiés l'aldéhyde bétulinique (pic 18), l'acide bétulonique (pic 19), l'acide 3-*O*-acétylbétulinique (pic 20), l'aldéhyde 3-*O*-acétyloléanolique (pic 21) et l'aldéhyde 3-*O*-acétylbétulinique (pic 22).

Les triterpènes pentacycliques sont reconnaissables par deux pics correspondant à des fragments m/z 189 et 203. Les oléananes donnent un pic à m/z 203 plus intense que celui à m/z 189, or les pics chromatographiques 8 et 21, respectivement l'acide oléanolique et l'aldéhyde 3-*O*-acétyloléanolique répondent à cette caractéristique. Les intensités de pics sont inversées dans le cas des lupanes. Dans le cas des oléananes, la formation des fragments m/z 189 et 203 peut être interprétée par un mécanisme rétro Diels-Alder suivi de la perte de CH₃ ou C-CH₃ et H₂ [5,12]. La figure II.5 a) explicite ces différentes étapes.

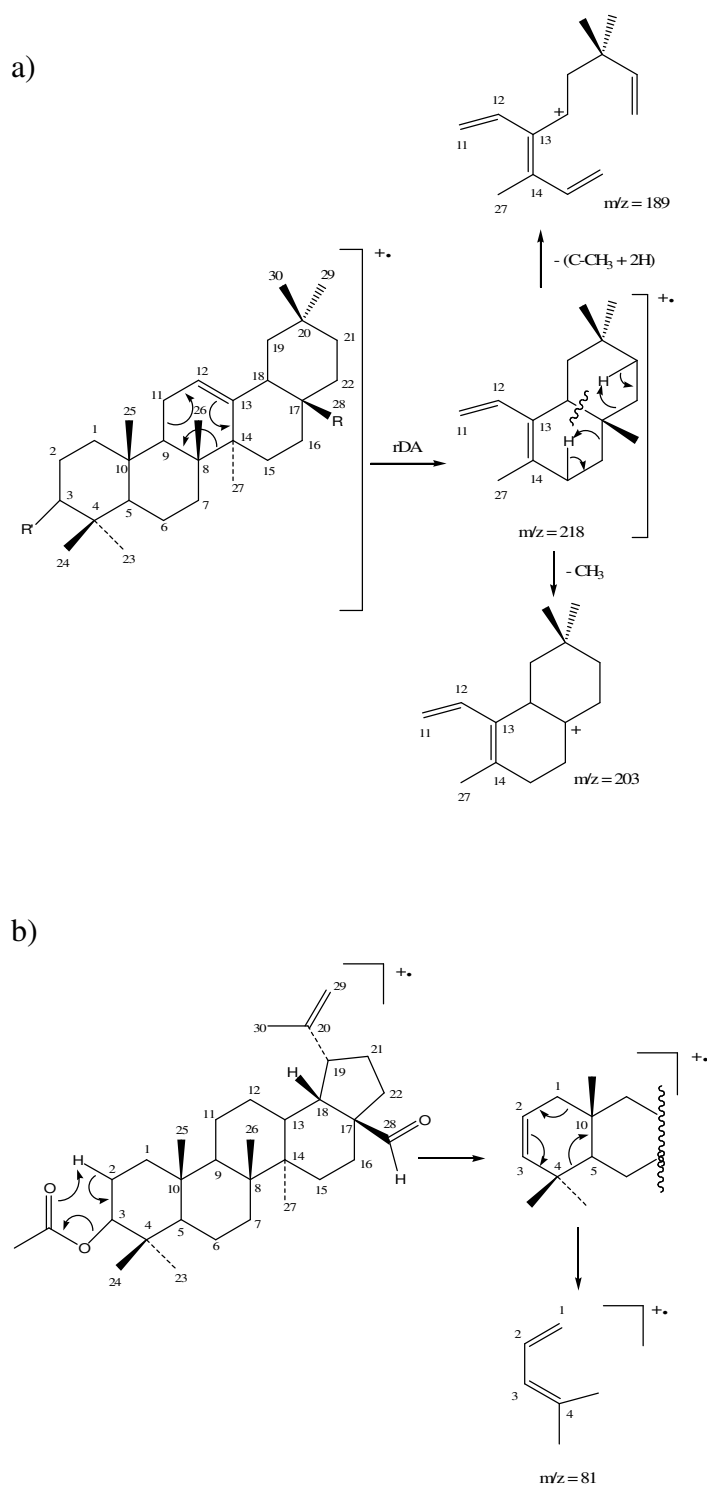


Figure II.5 : a) Fragmentation d'un squelette triterpénique pentacyclique de type oléane [5,12].
 b) Fragmentation d'un squelette triterpénique pentacyclique lupane acétylé.

Bien que les résultats obtenus pour les dérivés lupanes de l'écorce de platane aient montré un pic à m/z 189 plus intense que celui à m/z 203, à notre connaissance, aucun mécanisme n'est proposé dans la littérature pour justifier la formation de l'ion m/z 189.

D'autre part, le spectre d'un dérivé triméthylsilylé fait apparaître un pic à m/z 73 ($(\text{CH}_3)_3\text{Si}^+$) ainsi que la perte d'un fragment neutre caractérisée par $[M-90]$ (TMSOH). Cette perte informe sur le nombre de fonctions silylées et, par conséquent, sur le nombre de fonctions alcools ou acides présentes dans chaque triterpène.

Enfin, la perte $[M-60]$ (AcOH) observée pour les dérivés *O*-acétates a permis d'identifier l'acide 3-*O*-acétylbétulinique (pic 20), l'aldéhyde 3-*O*-acétyloléanolique (pic 21) ainsi que l'aldéhyde 3-*O*-acétylbétulinique (pic 22). Ce dérivé acétylé de l'aldéhyde bétulinique présente un pic de base à m/z 81. Un mécanisme de fragmentation est proposé dans la figure II.5 b).

L'ensemble de ces résultats confirme les performances de la CPG-SM en impact électronique pour l'analyse d'extraits végétaux. Nous avons identifié huit triterpènes pentacycliques dans l'écorce de platane par la corrélation des temps de rétention et des spectres de masse pour trois d'entre eux et par l'interprétation des spectres de masse pour les cinq autres. Les acides gras présents dans l'échantillon ne gênent pas l'analyse des triterpènes grâce à des temps de rétention inférieurs à 10 minutes.

c) Chromatographie en phase liquide

Le caractère non volatil des triterpènes pentacycliques non dérivés peut rendre leur analyse par chromatographie en phase liquide plus simple et plus rapide à mettre en œuvre que la chromatographie en phase gazeuse. Dans ce paragraphe, une recherche des conditions favorables à l'analyse par CPL de dérivés triterpéniques est discutée à partir de travaux publiés ainsi que de résultats obtenus au cours de ce travail de thèse.

Nous nous focaliserons sur les trois acides triterpéniques qui ont été analysés dans les extraits végétaux suivants : gousses d'amande [15], écorces de platane [11] ou de liège [16]. Ces acides (bétulinique, oléanolique et ursolique) présentent des caractères anti-cancéreux, anti-inflammatoire et anti-HIV [2,13-14].

c-1) CPL-UV et CPL-DEDL

Si l'avantage présenté par l'analyse CPL des acides triterpéniques est la simplification du protocole de préparation d'échantillon en l'absence d'étape de dérivation, l'inconvénient réside en la faible sensibilité de la détection par spectrophotométrie d'absorption UV. Les acides triterpéniques ne possèdent que deux groupements chromophores, une fonction éthylénique et une fonction acide carboxylique, dont les coefficients d'absorption molaire respectifs sont $\epsilon(190 \text{ nm}) = 8000$ et $\epsilon(210 \text{ nm}) = 70$ [17]. Ainsi, leur détection UV est réalisable à faibles longueurs d'onde (210 nm). Le dosage par étalonnage externe de l'acide bétulinique dans l'écorce du *Doliocarpus Schottianus* (vigne) [18] et des acides oléanolique et ursolique dans un extrait de *Perilla frutescens* [19] ont montré des LOD respectivement égales à 1,71 $\mu\text{g/mL}$ et 0,1 $\mu\text{g/mL}$ avec des longueurs d'onde de détection de 210 et 206 nm. D'autre part, les acides triterpéniques sont hydrophobes ($\log P = 6-7$, d'après Pallas, CompuDrug, Hongrie) et leur analyse sur phase inverse nécessite un pouvoir d'élution de la phase mobile suffisamment élevé. Il en résulte des résolutions souvent médiocres pour les séparations sur phase inverse de composés triterpéniques structurellement proches. Ce cas de figure est notamment rencontré avec les isomères de position tels que les acides oléanolique et ursolique. Une colonne suffisamment longue (Spherisorb ODS : 25 cm x 4,6 mm i.d., 5 μm) a permis d'obtenir une résolution de 1,5 avec une phase mobile ACN / H₂O (H₃PO₄, 1,25 %) (86/14, v/v) et un débit de 0,5 mL/min [19]. La durée de l'analyse est alors de 20 minutes. D'autre part, l'analyse d'un mélange de 12 triterpènes dont les acides oléanolique, ursolique et bétulinique a été optimisée sur une colonne ReproSil-Pur ODS-3 (25 cm x 4 mm i.d., 5 μm) en gradient d'élution avec une phase mobile MeOH / H₂O / AcOH pour l'identification de dérivés triterpéniques contenus dans des résines *frankincense* indiennes et africaines [54].

Une méthode de séparation des acides oléanolique, ursolique et bétulinique a été mise au point au laboratoire sur une colonne Lichrospher 100 RP-18 (12,5 cm x 4 mm i.d., 5 μm , Merck). La phase mobile est un mélange ACN / tampon phosphate pH 3,5 (70/30, v/v) auquel un agent d'interactions hydrophobes (cyclodextrines) a été ajouté. La diméthyl- β -cyclodextrine (DM- β -CD, DS = 1,8) et l'hydroxypropyl- γ -cyclodextrine (HP- γ -CD, DS = 0,6) fournies par Wacker Chemie (Munich, Allemagne) ont été testées séparément. L'insertion des solutés au sein de la cavité hydrophobe de la cyclodextrine forme des complexes de polarité supérieure à celle des solutés libres. La rétention des acides triterpéniques diminue et on observe une amélioration de la sélectivité avec, parfois, une inversion de l'ordre d'élution. La

séparation des acides oléanolique et ursolique est optimale avec 6 mM de DM- β -CD dissoute dans la phase mobile (**Figure II.6 (b)**).

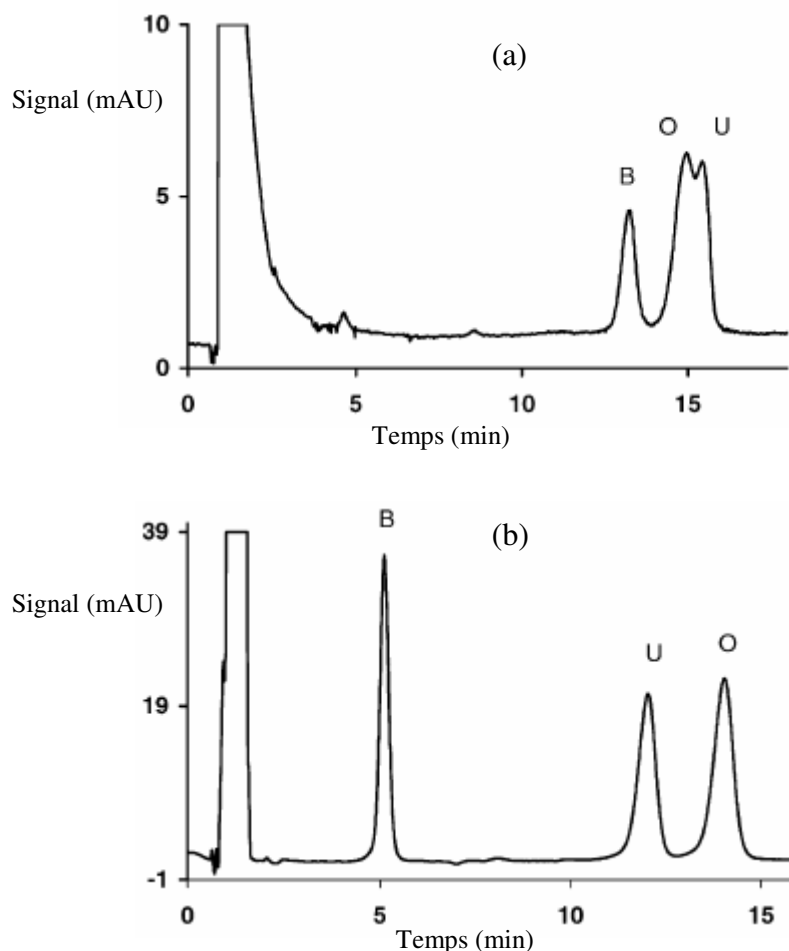


Figure II.6: Séparation d'un mélange standard d'acides bétulinique (B), oléanolique (O) et ursolique (U) (200 µg/mL) par CPL. Colonne : Lichrospher 100 RP-18 (125 x 4 mm i.d., 5 µm, Merck). Phase mobile (a) sans cyclodextrine, (b) avec cyclodextrine (DM- β -CD 6 mM). Détection à 225 nm.

En supposant un modèle de complexation triterpène:CD / 1:1, les constantes de complexation des acides avec la DM- β -CD et la HP- γ -CD ont été déterminées par CPL. Comme attendu, la stabilité de ces complexes d'inclusion dépend non seulement de la taille et de l'hydrophobie des triterpènes mais aussi de la composition de la phase mobile (**Tableau II.4**, [20]). On relève des valeurs de constantes de complexation (K_f) plus élevées avec la HP- γ -CD qu'avec la DM- β -CD. Ce résultat est interprété par la faible taille de la cavité de la DM- β -CD, défavorisant la formation de complexes d'inclusion stables avec les triterpènes pentacycliques. D'autre part, les valeurs de K_f diminuent lorsque la proportion en acétonitrile, compétiteur hydrophobe, augmente dans la phase mobile.

Acetonitrile (%, v/v)	Solute	Slope $\times 10^3$	Intercept $\times 10^2$	r^2	K_f (M^{-1})
DM- β -CD					
55	B	0.6	1.48	0.9812	40
	O	2.2	1.35	0.9928	162
	U	0.6	1.38	0.9648	43
60	B	1.0	2.34	0.993	43
	O	3.1	2.00	0.9975	155
	U	1.0	2.00	0.9987	50
65	B	1.2	3.81	0.8566	31
	O	3.4	3.43	0.9672	99
	U	1.0	3.40	0.8054	29
70	B	1.1	6.20	0.9096	18
	O	4.1	5.23	0.9895	78
	U	1.1	5.32	0.9888	21
HP- γ -CD					
50	B	22.2	0.64	0.9995	3469
	O	6.6	0.64	0.9905	1031
	U	7.9	0.76	0.9964	1039
60	B	27.8	3.15	1	883
	O	8.8	2.71	0.9987	325
	U	10.5	2.70	0.9990	389
65	B	30.1	5.08	0.9995	593
	O	10.1	3.99	0.9982	253
	U	11.8	4.03	0.9985	293
70	B	35.2	5.27	0.9708	668
	O	10.9	6.3	0.9951	173
	U	12.4	6.67	0.9939	186

Tableau II.4 : Valeurs des constantes de complexation (K_f , M^{-1}) obtenues par régression linéaires $1/k$ en fonction de $[CD]$ pour différentes compositions de la phase mobile [20]. Conditions chromatographiques identiques à celles de la figure II.6. Acide bétulinique (B), acide oléanolique (O), acide ursolique (U).

Cependant, les cyclodextrines sont des composés non volatils incompatibles avec le couplage CPL/DEDL ou CPL/SM. Or, ces deux modes de détection sont d'un grand intérêt pour analyser des molécules ayant de faibles absorptions UV. Les acides triterpéniques répondant à ce critère, une méthode CPL avec une phase mobile volatile a été mise au point. Le choix de la phase stationnaire s'est porté sur un support à base de carbone graphitique poreux connu pour sa capacité à séparer des composés de structures très proches tels que des isomères de position. Un résultat satisfaisant a été obtenu en utilisant une colonne Hypercarb (10 cm x 4,6

mm i.d., 5 μ m, Thermo-Hypersil) et une phase mobile non aqueuse ACN / CHCl₃ (50/50, v/v) (**Figure II.7**). Les produits sont détectés grâce à un détecteur évaporatif à diffusion de la lumière (DEDL, modèle Sedex 55, Sedere, France) dont les paramètres sont les suivants : température d'évaporation: 35°C, pression du gaz nébuliseur: 0,22 MPa, gain: 8. La durée de l'analyse est voisine de cinq minutes [21].

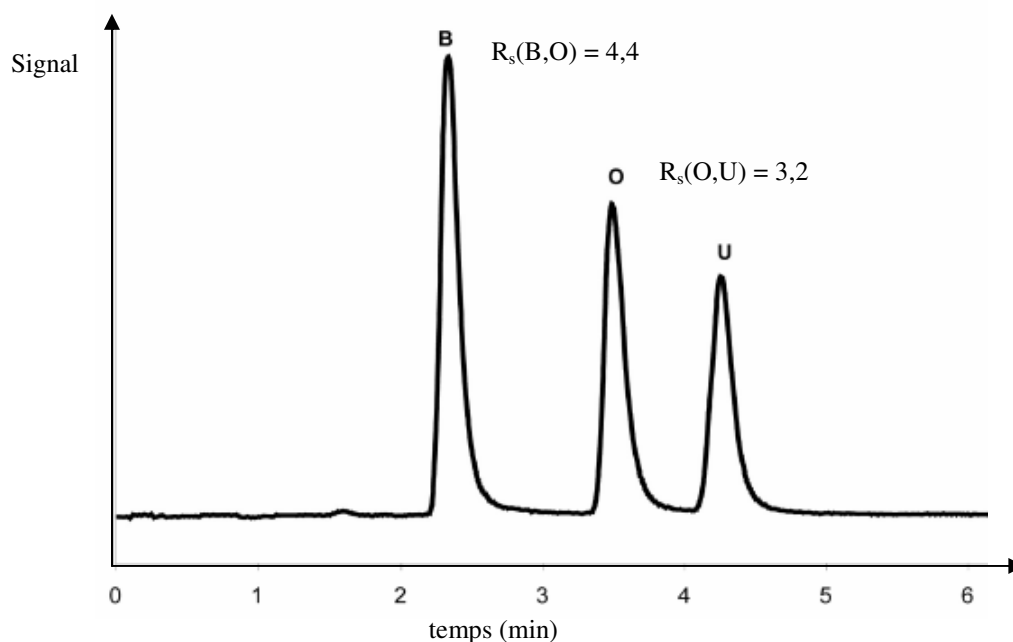


Figure II.7 : Séparation d'un mélange standard d'acides bétulinique (B), oléanolique (O) et ursolique (U) (200 μ g/mL) par CPL.
Colonne : Hypercarb (100 x 4,6 mm i.d., 5 μ m, Thermo-Hypersil). Phase mobile : ACN / CHCl₃ (50/50 (v/v)). Détecteur évaporatif à diffusion de la lumière.

Le système chromatographique présente une sélectivité satisfaisante sans ajout d'agent complexant dans la phase mobile. Des sélectivités équivalentes ont été obtenues avec les autres couples de solvants organiques ACN / CHCl₃, ACN / CH₂Cl₂, ACN / MTBE et MeOH / MTBE. Cependant, les forces éluantes de CH₂Cl₂ et de MTBE étant inférieures à celle de CHCl₃, les temps d'analyse augmentent.

c-2) CPL-SM

Les modes d'ionisation électrospray (ESI) ou chimique à pression atmosphérique (APCI), associés à la spectrométrie de masse, sont non seulement bien plus sensibles que le DEDL ou l'UV pour cette famille de composés, mais fournissent des informations structurales sur les triterpènes analysés. Le mode d'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI)

améliore, par chauffage, la réponse de la spectrométrie de masse dans le cas de composés peu volatils tels que les triterpènes.

Nous n'avons pas réalisé de couplage CPL-SM pour l'analyse des triterpènes au cours de ce travail de thèse, en revanche, des résultats obtenus par d'autres équipes ont été publiés. Ainsi, la spectrométrie de masse en mode APCI a été utilisée en ligne à la suite d'un système CPL-UV (225 nm) pour l'analyse d'un extrait de *Salvia Officinalis* [2]. Les auteurs ont identifié le pic de l'acide ursolique par comparaison de son temps de rétention avec celui obtenu grâce à une solution standard. L'analyse APCI-SM en mode négatif a confirmé la présence d'acide ursolique par son pic pseudo-moléculaire [M-H] à $m/z = 455,5$.

D'autre part, les saponines sont dotées d'une polarité supérieure à celle de leur forme aglycone. L'analyse structurale de ces composés non volatils est réalisée par CPL-SM.

Ainsi, la CPL-ESI-SM (mode positif) et la nano CPL-ESI-SM (mode positif) appliquées à un extrait purifié de *Chenopodium quincoa* ont permis d'établir la séquence oligosaccharidique des saponines majoritaires [22]. Puis, une hydrolyse acide du même extrait a cassé la liaison osidique et libéré les triterpènes sous leur forme aglycone, ces derniers ont alors été analysés en CPG-SM après triméthylsilylation. Par ces deux méthodes croisées, les auteurs ont identifié plusieurs saponines issues de l'acide oléanolique avec des enchaînements d'hexoses et/ou de pentoses liés à l'atome d'oxygène de la fonction alcool en position 3 ou bien à celui de la fonction acide carboxylique en position 28 (**Figure II.2**).

L'ionisation chimique à pression atmosphérique des saponines, à 450°C, favorise la décomposition de ces molécules riches en atomes d'oxygène, avec la perte de fragments neutres (sucre, H₂O, AcOH). L'obtention de plusieurs fragments en SM simple a ainsi permis une identification de la structure des triterpènes glycosylés contenus dans des produits diététiques issus de plantes [23] par CPL-APCI-SM en mode positif.

Des résultats équivalents ont été obtenus par SMⁿ grâce à une trappe ionique. Ainsi, une saponine dont la forme aglycone est l'acide oléanolique, extraite de la *Phyto lacca dodecaudra* a été fragmentée jusqu'à l'obtention de sa forme aglycone. Cette analyse a permis l'identification d'un enchaînement de trois unités glucose et d'une unité rhamnose fixées sur la fonction alcool en position 3 ainsi que d'une unité glucose formant une fonction ester avec la fonction acide en position 28 [24].

Dans tous les exemples précédents, la séparation chromatographique a été réalisée sur une colonne de silice greffée C₁₈ avec une phase mobile ACN-H₂O (TFA ou HCOOH ou AcOH

0,1 %). La différence de polarité importante entre les saponines et leurs formes aglycones, souvent présentes dans le même échantillon, nécessite des gradients d'éluant balayant une large gamme de force éluante.

d) Electrophorèse capillaire

L'électrophorèse capillaire permet la séparation de composés en solution par leur différence de vitesse de migration dans un champ électrique ($V = 20-30$ kV). La séparation a lieu au sein d'un capillaire étroit de diamètre interne compris entre 25 et 75 μm et rempli d'un électrolyte. Deux forces permettent la migration des molécules analysées, l'une d'elles apporte la mobilité électrophorétique propre à chaque molécule chargée et l'autre constitue le flux électroosmotique (FEO), mouvement de l'électrolyte dans le capillaire. C'est la mobilité électrophorétique qui assure la sélectivité de la séparation des composés. Ce mode d'analyse est appelé électrophorèse capillaire de zone (CZE), il existe aussi l'électrochromatographie micellaire (MEKC) et l'électrophorèse capillaire en milieu non aqueux (NACE) [25].

La CZE est simple à mettre en œuvre mais elle n'est pas favorable à l'analyse des triterpènes sous forme aglycone, ces molécules hydrophobes ayant une faible solubilité dans les électrolytes aqueux.

Une alternative à cette difficulté est la MEKC. Les molécules s'insèrent dans la partie centrale et hydrophobe des micelles. Ainsi, les acides oléanolique et ursolique contenus dans le fruit séché du *Cornus Officinalis* ont pu être séparés avec un électrolyte constitué du mélange tampon borate de sodium (40 mM) / MeOH 95/5 (v/v) auquel a été ajouté du dodécylsulfate de sodium (SDS) (25 mM) et de l'hydroxypropyl- β -cyclodextrine (HP- β -CD) (15 mM) [26]. La tension appliquée aux extrémités du capillaire est positive et la détection a lieu par absorption UV (200 nm). Après tracé des droites d'étalonnage, la LOD a été évaluée à 1,6 $\mu\text{g/mL}$ pour chaque acide triterpénique. Le MeOH favorise la solubilité des solutés et améliore la symétrie des pics. Les solutés sous forme anionique à pH 9,3 migrent en sens opposé au FEO. L'insertion des triterpènes dans les micelles diminue la mobilité électrophorétique des solutés mais ne suffit pas à apporter au système une sélectivité suffisante à la séparation des deux acides triterpéniques. L'ajout de cyclodextrines neutres entraîne la formation de complexes d'inclusion et permet d'obtenir une résolution supérieure à 1,5 entre les pics des acides ursolique et oléanolique. L'identification de ces deux métabolites secondaires contenus dans l'extrait de *Cornus Officinalis* a alors été possible à partir de solutions standards, avec une durée d'analyse de 9 minutes.

Une étude similaire a été menée à partir d'un extrait d'une herbe médicinale chinoise, *Ligustrum Lucidum Ait*, riche en acides oléanolique et ursolique, principales molécules actives [27]. La HP- β -CD a été remplacée par la γ -CD. Le résultat final est très satisfaisant puisqu'il reporte la séparation des deux acides avec une résolution de 1,8 dans un tampon borate pH 8,5 contenant 60 mM de SDS et 2 mM de γ -CD. La durée de l'analyse est de 4 minutes seulement.

L'électrophorèse capillaire en milieu non aqueux (NACE) évite le problème de solubilité des triterpènes. Ainsi, les acides oléanolique et ursolique, présents dans l'extrait d'une herbe médicinale chinoise, la *Rabdosia Japonica*, ont été séparés en 15 min avec une sélectivité satisfaisante grâce à un électrolyte constitué de solvants organiques MeOH / ACN 65/35 (v/v) et de trishydroxyméthylaminométhane (Tris) [28].

L'électrophorèse capillaire présente un avantage incontestable dans le cas d'analyse de faibles quantités d'échantillon. Dans le cadre de cette thèse, les extraits de plante ont été analysés par CPL-UV et CPL-DEDL, méthodes simples et répétables, au détriment de la MEKC ou NACE souvent plus délicates à mettre en œuvre et moins répétables.

II.1.3. Préparation d'un extrait de plantes

Ce paragraphe présente les différents moyens d'extraction d'une plante puis des méthodes de préparation d'un extrait riche en triterpènes avant son analyse chromatographique [29].

a) Fractionnement de familles de composés à partir de la plante séchée – Obtention d'un extrait de plantes

La préparation d'un extrait de plante présente un nombre variable d'étapes selon l'objectif suivi.

La partie de la plante sélectionnée pour sa richesse hypothétique en espèces actives (feuille, écorce, racine...) est d'abord séchée puis finement broyée avant de subir une extraction (aqueuse ou organique) capable d'isoler une ou plusieurs familles de molécules. Plusieurs techniques permettent de réaliser ce travail. Il y a les extractions par Soxhlet, ultrasons, micro-ondes, fluide supercritique ainsi que l'extraction accélérée par solvant (ASE). Parmi les nombreux travaux publiés sur le screening des plantes, l'extraction par Soxhlet est fréquemment mentionnée pour l'obtention de fractions riches en triterpènes.

Cette méthode relativement ancienne (milieu 19^{ème} siècle) est efficace et encore largement utilisée. Le principe du fonctionnement d'un Soxhlet est bien connu, il faut juste mentionner

le volume de solvant (300 mL) nécessaire pour extraire 10 g de plante séchée. L'échantillon est extrait par un solvant chaud durant une longue période (6 - 48 h). Le solvant s'enrichit en composés solubilisables. Dans les années 1990, l'extraction par Soxhlet a été automatisée (nom commercial de l'appareil: Soxtet) pour extraire simultanément de deux à six échantillons. Une extraction dure environ 2 heures. L'étape d'évaporation est relativement courte puisqu'il s'agit d'évaporer 50 mL de solvant au lieu de 300 mL pour le système classique.

Si le chloroforme est un solvant favorable à l'extraction des triterpènes aglycones, il est préférable de réaliser une extraction préalable à l'hexane afin d'éliminer certains composés très apolaires tels que les lipides ou les triacylglycérols à longues chaînes [2]. Le méthanol constitue aussi un excellent solvant des triterpènes aglycones [30]. Enfin, l'acétate d'éthyle a été utilisé avec de bons résultats pour l'extraction de l'acide bétulinique à partir des feuilles, du bois ou encore de l'écorce de pieds de vigne [18]. Chaque solvant, par sa polarité, apporte sa propre sélectivité à l'extraction.

En conclusion, cette méthode d'extraction présente l'avantage d'être peu onéreuse et d'être applicable à n'importe quel type de matrice. Toutefois, l'utilisation de solvants organiques néfastes à l'environnement et la longueur de la durée d'extraction sont des inconvénients souvent mentionnés.

A l'opposé, l'extraction par le dioxyde de carbone supercritique est une méthode propre éliminant tout problème de retraitement des solvants. D'autre part, l'extraction accélérée par solvant (ASE) et l'extraction par micro-ondes (MAE) répondent aux exigences de rapidité et de quantité d'échantillon traité. Ainsi, une quantité importante d'échantillon (100 g) peut être extraite par ASE en une seule étape (20 min).

b) Extraction solide-liquide (SPE)

Au cours des travaux expérimentaux réalisés au laboratoire, aucune extraction directe de plante n'a été effectuée. Les extraits riches en triterpènes nous ont été fournis par les laboratoires LVMH Recherche (Saint-Jean-de-Braye, France).

Les extraits végétaux sont riches de nombreuses molécules appartenant à des familles très diverses. L'isolement d'un nombre restreint de molécules nécessite des étapes supplémentaires de fractionnement. La littérature propose de nombreuses méthodes d'extraction de plantes par SPE. Nous ne mentionnerons que celles relatives aux échantillons

contenant des triterpènes et développerons nos propres résultats, obtenus pour la préparation d'un extrait d'écorces de platane avant analyses par CPG-SM, CPL-UV et CPL-DEDL.

b-1) Sur silice greffée C₁₈

J. F.Cui a montré l'intérêt d'une phase stationnaire apolaire Si-C₁₈ pour éliminer les matrices très polaires des extraits méthanoliques de plantes. L'étape de lavage est réalisée par un mélange MeOH-H₂O. L'étape d'élution au MeOH entraîne les triterpènes aussi bien sous forme aglycone que sous forme de saponines [9].

Une autre approche consiste à réaliser successivement deux extractions solide-liquide avec des supports de polarités opposées. Ainsi, ce processus de double SPE en phase normale (silice) puis en phase inverse (Si-C₁₈) a permis d'éliminer les composés de polarités extrêmes et de récupérer les triterpène lors de l'étape d'élution [18].

Par ailleurs, nous avons réalisé une SPE sur silice greffée C₁₈ (DSC-18 Supelco, 500 mg / 3 mL) sur un extrait méthanolique d'écorces de platane dissous dans un mélange MeOH / H₂O 85/15 (v/v). Un lavage MeOH / H₂O 75/25 (v/v) élimine la matrice polaire de l'échantillon alors que ses constituants les plus hydrophobes sont retenus par la phase stationnaire. Ces derniers sont élués durant l'étape d'élution par le méthanol pur (Annexe VIII, §2.a). L'analyse par CPG-SM indique la présence des dérivés triterpéniques et des acides gras au sein de cette phase d'élution (voir **Figure II.4**).

Si ces deux familles de molécules sont parfaitement séparées en CPG, cette sélectivité n'est pas retrouvée en CPL sur phase inverse. Les chromatogrammes montrent la disparition de la matrice polaire lors de l'extraction SPE (**Figure II.8 (1)**) ainsi que la présence des acides gras et des espèces triterpéniques après l'étape d'élution (**Figure II.8 (2)**). On remarque la proximité des pics d'acide linoléique et d'acide bétulinique. L'acide palmitique est élué au milieu d'un massif de pics de faible intensité, identifiés comme dérivés triterpéniques minoritaires.

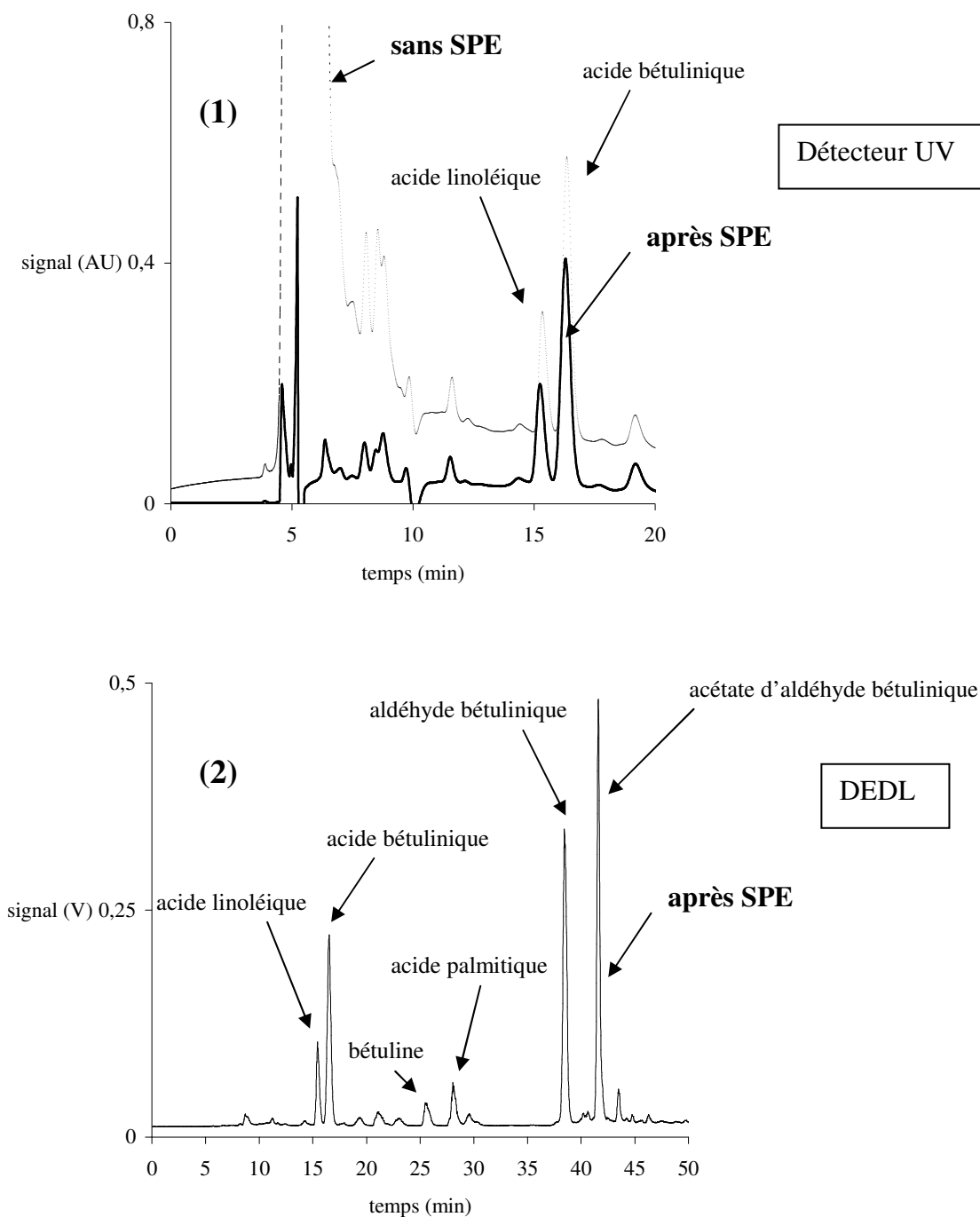


Figure II.8 : (1) Superposition des chromatogrammes obtenus par CPL-UV de l'extrait d'écorces de platane sans et après SPE C₁₈. (2) Chromatogramme obtenu par CPL-DEDL de l'extrait d'écorces de platane après SPE C₁₈.

Colonne : Spherisorb ODS (25 cm x 4,6 mm i.d., 5 µm). Phase mobile : (0-30 min) ACN / tampon AcOH-NH₃ (force ionique 20 mM, pH 3) 86/14 (v/v) puis (31-50 min) MeOH. Débit : 0,5 mL/min. Détecteurs : UV (210 nm), DEDL (45 °C ; 2,2 bars).

Aucun des protocoles SPE Si-C₁₈ décrits ne permet l'extraction sélective des triterpènes.

Un autre type de support SPE (échangeur anionique) a été testé afin d'utiliser le caractère anionique des acides triterpéniques.

b-2) Sur support échangeur anionique (faible ou fort)

Deux approches illustrent l'extraction sélective de molécules acides contenues dans des échantillons végétaux. Les étapes de lavages et d'élution sont adaptées à la polarité de la matrice. La première méthode, tirée de la littérature, traite d'une matrice très hydrophobe. La seconde méthode porte sur les travaux réalisés au laboratoire sur un extrait méthanolique d'écorces de platane, matrice moyennement polaire.

Trois acides triterpéniques (acides oléanolique, maslinique et ursolique) présents dans de l'huile d'olive vierge ont été extraits sur une cartouche remplie de silice greffée aminopropyle [31]. Les composés acides sont retenus sur la phase stationnaire par interactions ioniques et par interactions dipôle-dipôle. Des lavages faiblement polaires éliminent la matrice très apolaire de l'huile. La dernière étape élue les acides triterpéniques et les acides gras par un mélange polaire et protique Et₂O / AcOH 98/2 (v/v). Il y a rupture des interactions ioniques existant entre les fonctions amine de la phase stationnaire et les fonctions acides des molécules recherchées.

Dans le cas d'un échantillon polaire, la rétention des composés ionisables par un support polaire, échangeur anionique faible tel que la silice greffée aminopropyle, risque d'être compromise par des liaisons hydrogène et des interactions ioniques interférentes. Un support échangeur anionique fort peut contrecarrer ces interactions parasites par une charge ionique permanente, indépendante de la nature du solvant de l'échantillon déposé.

Nous avons ainsi cherché à optimiser l'extraction des acides triterpéniques présents dans un extrait méthanolique d'écorces de platane sur un support échangeur anionique fort (Annexe VIII, §3.b). Les constituants les plus polaires de la matrice ont été éliminés par SPE C₁₈. Puis, une SPE sur silice greffée triméthylaminopropyle, échangeur anionique fort (SAX), est mise au point avec un dépôt de l'échantillon dans un mélange MeOH / HCO₃NH₄ (I = 50 mM; pH 7,95) 85/15 (v/v). Le pH de cette phase de dépôt favorise l'ionisation et la rétention des acides triterpéniques et des acides gras par interactions ioniques. Un lavage au MeOH élue les molécules neutres telles que les alcools triterpéniques ou encore l'aldéhyde et l'acétate d'aldéhyde bétulinique, principaux constituants de l'écorce de platane. Enfin, le mélange MeOH / tampon AcOH-NH₃ (I = 100 mM; pH 3,7) 85/15 (v/v) provoque le recul d'ionisation des acides et leur élution. Les rendements d'extraction des acides triterpéniques (supérieurs à 95 %) et de certains acides gras (compris entre 85 et 90 %) ont été évalués à partir de

solutions standards. Ces valeurs justifient le choix d'un support d'extraction de type échangeur anionique fort, capable de retenir les acides triterpéniques au cours du lavage polaire (MeOH) nécessaire à l'élution des molécules neutres de la matrice.

Deux remarques peuvent être faites à partir de l'analyse des différentes fractions SPE-SAX:

- L'étape d'élution révèle la présence d'un acide non identifié, dont le temps de rétention en CPL est identique à celui de l'acétate d'aldéhyde bétulinique.
- De plus, le protocole SPE ne permet pas d'éliminer l'acide linoléique de la fraction contenant l'acide bétulinique (**Figure II.9**).

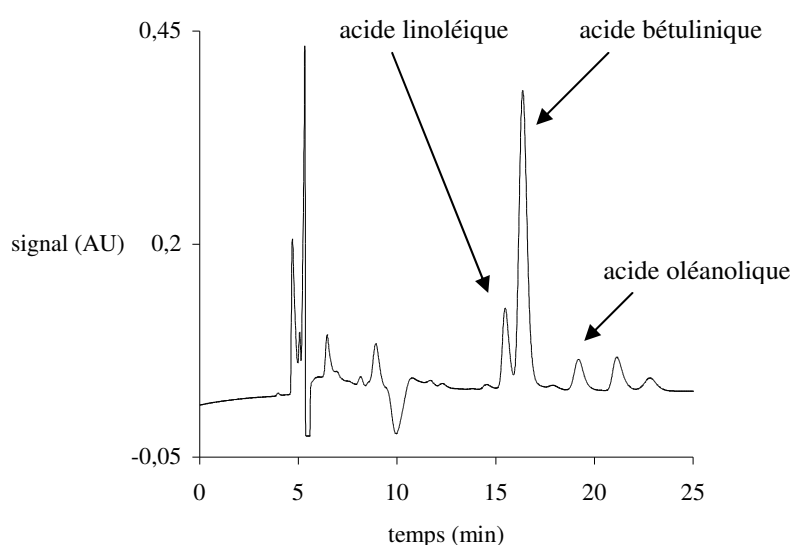


Figure II.9 : Chromatogramme obtenu par CPL-UV de l'extrait d'écorce de platane après SPE combinée C₁₈-SAX.

Colonne : Spherisorb ODS (25 cm x 4,6 mm i.d., 5 µm). Phase mobile : ACN / tampon AcOH-NH₃ (force ionique 20 mM, pH 3) 86/14 (v/v). Débit : 0,5 mL/min. Détecteur : UV (210 nm).

Le support SAX a confirmé son pouvoir d'extraction sélective des espèces ionisables contenues dans une matrice moyennement polaire. En revanche, ce support ne permet pas de séparer les acides triterpéniques des acides gras.

Ainsi, une approche d'extraction sélective de la famille des triterpènes, selon un processus de reconnaissance de forme, sera abordée dans la seconde partie de ce chapitre.

II.1.4. Conclusion

La littérature mentionne de nombreuses méthodes d'extraction et d'analyse des triterpènes pentacycliques contenus dans des extraits de plantes. Nous avons souligné le potentiel des méthodes analytiques actuelles (CCM, RMN, CPG et CPL-SM) pour l'identification de

molécules contenues dans les matrices végétales. Les performances des méthodes chromatographiques sont optimales lorsque le prétraitement de l'échantillon est suffisamment sélectif en espèces recherchées. Les cartouches commerciales Si-C₁₈ et SAX ont échoué à extraire spécifiquement la famille des triterpènes pentacycliques contenus dans un extrait d'écorces de platane même si deux critères de reconnaissance, hydrophobie et caractère anionique, ont été pris en compte. Afin d'établir un protocole à la fois simple et sélectif d'extraction des triterpènes pentacycliques présents au sein de matrices complexes, nous nous sommes intéressés aux propriétés de reconnaissance de forme des polymères à empreintes moléculaires (MIP).

II.2) PREPARATION ET EVALUATION DU POLYMERE A EMPREINTES MOLECULAIRES DE L'ACIDE 18- β -GLYCYRRHETINIQUE

II.2.1. Choix des polymères à empreintes moléculaires pour l'extraction sélective de l'acide 18- β -glycyrrhétinique, molécule active contenue dans un extrait de plantes

La racine de réglisse, *Glycyrrhiza glabra*, est utilisée dans la préparation de tisanes prescrites pour le traitement d'inflammations diverses. Les racines de réglisse séchées et broyées finement sont extraites par de l'eau portée à ébullition, la solution aqueuse est ensuite évaporée à sec afin d'obtenir l'extrait. L'activité de ce dernier vient du pouvoir immunomodulateur de son principal constituant, l'acide glycyrrhizique (acide 3-O-(2-O- β -D-glucopyranuronosyl- α -D-glucopyranuronosyl)-3 β -hydroxy-11-oxo-18 β ,20 β -oléan-12-én-29-oïque). La forme aglycone de l'acide glycyrrhizique est le triterpène, acide 18- β -glycyrrhétinique (noté Ac- β -Gly). On trouve aussi dans l'extrait de racine de réglisse l'acide 18- α -glycyrrhétinique (noté Ac- α -Gly), épimère du précédent acide. Ce dernier ne présente aucune activité biologique.

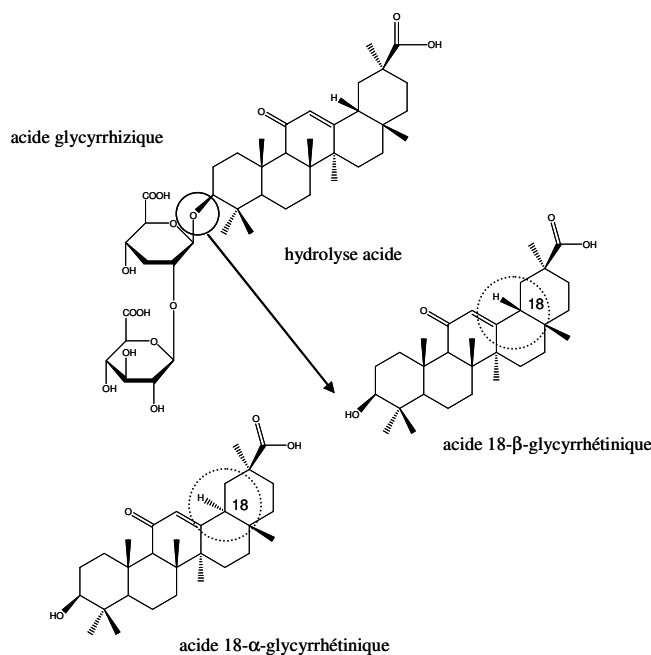


Figure II.10 : Structures de l'acide glycyrrhizique, de l'acide 18- β -glycyrrhétinique et de son épimère, l'acide 18- α -glycyrrhétinique.

L'analyse de l'acide glycyrrhétinique (α et β) est principalement réalisée par CPL en phase inverse avec détection UV à 254 nm. Des applications reportent l'analyse de formulations pharmaceutiques [32], ainsi que l'analyse de plasma précédée d'une préparation de l'échantillon par extractions liquide-liquide ou solide-liquide [33-34] avec des recouvrements supérieurs à 85 %.

A notre connaissance, l'extraction spécifique de l'Ac- β -Gly à partir de polymères imprimés n'a jamais été appliquée à l'extrait hydrolysé de racines de réglisse.

L'application des MIPs à l'extraction sélective de métabolites secondaires polaires a déjà été réalisée par d'autres équipes. Ainsi, la mise en place de SPE sur MIP pour l'extraction sélective de flavonoïdes, telles que la quercétine et le kaempferol contenus dans des extraits naturels de feuilles de *Gingko* [35] ou de racines de *Caragana Jubata* [36], a apporté des résultats satisfaisants. Dans les deux cas, il s'agissait d'extraire des molécules polaires d'une matrice elle-même très polaire. La formation d'empreintes à partir de liaisons hydrogène entre le monomère fonctionnel (acrylamide), et la molécule empreinte (quercétine), a permis la rétention sélective par le polymère de la quercétine et de molécules de structure apparentée (kaempferol, picéatannol, butéine) lors des étapes de lavage. Les recouvrements obtenus à l'élution sont élevés (90 % pour la quercétine contenue dans l'extrait de *Gingko* et 80 % pour la butéine et le picéatannol contenus dans l'extrait de *Caragana Jubata*). L'analyse par chromatographie en phase liquide avec détection UV (365 nm) procure des chromatogrammes exempts de pics interférents issus de la matrice.

Ces résultats encourageants ont conduit à synthétiser un polymère à empreintes moléculaires à partir de l'Ac- β -Gly pris comme molécule empreinte. L'acide méthacrylique (MAA) est choisi comme monomère fonctionnel, interagissant avec la molécule empreinte par liaisons hydrogène. Ces interactions sont favorisées par un solvant porogène peu polaire, le chloroforme. L'agent réticulant est l'éthylène glycol diméthacrylate et la polymérisation a lieu par voie thermique. Le protocole est reporté en annexe IV. Un polymère non imprimé (Non Imprinted Polymer, NIP) est préparé dans des conditions identiques à celles du MIP, mais en absence d'Ac- β -Gly.

L'acide méthacrylique est supposé former des liaisons hydrogène avec les fonctions alcool, cétone et acide carboxylique de l'Ac- β -Gly (**Figure II.11**).

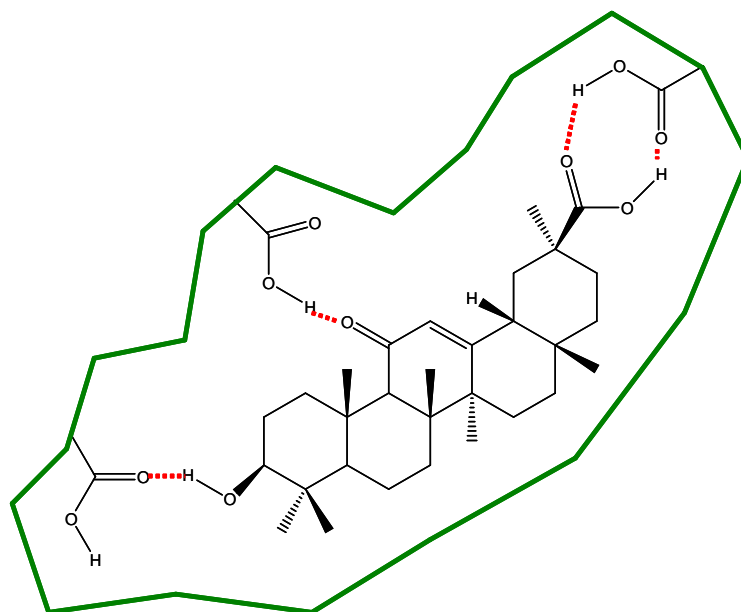


Figure II.11: Schéma de l'empreinte formée autour de l'Ac-β-Gly à partir de liaisons hydrogène (. . .) formées avec le MAA.

II.2.2. Evaluation du MIP – Ac-β-Gly

a) Mise en évidence de la formation d'empreintes

Une étude de recapture sous contrôle thermodynamique a été réalisée afin de mettre en évidence la formation d'empreintes spécifiques de l'Ac-β-Gly. Des solutions d'Ac-β-Gly à 20 µg/mL sont préparées dans le solvant porogène (CHCl₃) puis introduites dans des vials contenant une masse donnée de MIP ou de NIP.

a-1) Conditions expérimentales

Des vials ambrés sont remplis de masses variables (2,5 – 100 mg) de MIP ou NIP. 1 mL d'une solution à 20 µg/mL d'Ac-β-Gly est introduit dans chaque vial. Les vials sont agités pendant 3 heures, à température ambiante. Puis, le contenu de chaque vial est filtré sur un filtre-seringue (volume 1 mL, porosité 0,2 µm et diamètre 13 mm, GHP Acrodisc, Gelman) prévus pour des solvants organiques. Le filtrat est ensuite évaporé à sec sous flux d'azote. Enfin, le résidu sec est dissous dans 1 mL de méthanol pour l'analyse par chromatographie en phase liquide. La concentration d'Ac-β-Gly en solution est déterminée après 3 heures d'agitation. La quantité, notée B, d'Ac-β-Gly adsorbé par le polymère est calculée à partir de

la différence entre la quantité totale, notée T, d'Ac- β -Gly introduite dans le vial et la quantité non adsorbée.

Les conditions chromatographiques d'analyse de l'Ac- β -Gly sont décrites en annexe V.

a-2) Isothermes d'adsorption de l'Ac- β -Gly

Les résultats obtenus sont présentés par un ensemble de points expérimentaux dont l'ordonnée représente la fraction d'Ac- β -Gly adsorbé par le polymère, notée B/T (%), et l'abscisse la concentration massique de polymère en suspension dans la solution. La figure II.12 rend compte de la différence de comportement du MIP et du NIP vis-à-vis de l'Ac- β -Gly.

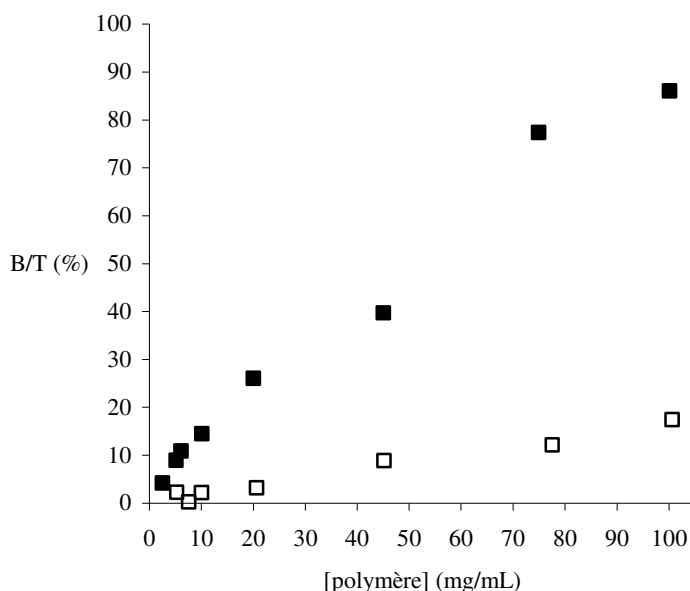


Figure II.12: Profils d'adsorption de l'Ac- β -Gly sur le MIP (■) et sur le NIP (□); T = 25 °C; volume solution = 1 mL; [Ac- β -Gly] = 20 μ g/mL dans CHCl₃.

La différence de profil entre les isothermes d'adsorption du MIP et du NIP prouve la présence d'empreintes dans le MIP. Quelle que soit la concentration en polymère, la quantité d'Ac- β -Gly retenue par le MIP est toujours supérieure à celle retenue par le NIP. Ainsi, pour 45 mg de polymère en suspension dans 1 mL de solution d'Ac- β -Gly dissous dans le chloroforme, 40 % de la quantité initiale d'Ac- β -Gly sont adsorbés par le MIP pour seulement 8 % par le NIP. Avec 80 mg de polymère, le résultat est encore plus probant puisque le MIP et le NIP adsorbent respectivement 80 % et 12 % d'Ac- β -Gly, soit une quantité recapturée 6,5 fois plus élevée pour le MIP que pour le NIP. L'adsorption de l'Ac- β -Gly par le NIP est due aux interactions non spécifiques. Ces interactions sont de même nature que celles mises en jeu

dans les empreintes, soient des liaisons hydrogène, liaisons de Van der Waals et interactions π - π . La répartition aléatoire de ces interactions dans la matrice polymérique du NIP ne tient pas compte de la structure de la molécule recherchée et rend la recapture moins efficace que dans le cas du MIP.

D'autre part, la reconnaissance de l'Ac- β -Gly par les empreintes du MIP est favorisée dans le solvant porogène, les microstructures du polymère reprenant une morphologie identique à celle adoptée au cours de la polymérisation [37-40].

b) Etude de la capacité du polymère à empreintes moléculaires

La quantité maximale d'Ac- β -Gly retenue par 60 mg de MIP contenus dans une cartouche SPE a été évaluée et comparée à celle relevée pour la même masse de NIP. Cette étude a été réalisée à partir de solutions standards.

b-1) Conditions expérimentales

60 mg de polymère (MIP ou NIP) sont introduits dans des cartouches SPE en polypropylène (volume 1 mL). Les particules de polymère sont maintenues entre deux frittés (porosité 20 μ m). Le protocole SPE est reporté dans le tableau II.5.

Etape	Composition du mélange	Volume (mL)
Conditionnement	1) MeOH	3
	2) CHCl ₃	6
Dépôt	Ac- β -Gly (42 – 744 nmole/mL) dissous dans CHCl ₃	0,5
Lavage	CHCl ₃	2
Elution	MeOH	1,5

Tableau II.5 : Protocole SPE appliqué au MIP et au NIP.

Les étapes de conditionnement préparent le polymère au dépôt de l'échantillon dans le chloroforme. Le dépôt est réalisé dans le solvant porogène, favorable à la rétention de la molécule empreinte par les sites spécifiques du MIP. Le volume de chloroforme percolé sur la cartouche à l'étape de lavage est optimisé à partir d'une solution d'Ac- β -Gly de concentration 50 μ g/mL (ou 106 nmol/mL) afin de réduire les interactions non spécifiques sans entraîner d'élution prématurée des molécules retenues par les empreintes du MIP. Enfin, l'étape d'élution met en jeu le méthanol, solvant capable de rompre les liaisons hydrogène existant

entre l'acide méthacrylique des empreintes et les groupements fonctionnels donneurs et accepteurs de liaisons hydrogène de l'Ac-β-Gly. Chaque fraction d'élution obtenue est évaporée à sec sous flux d'azote puis dissoute dans 0,5 mL de méthanol pour être analysée par chromatographie en phase liquide - UV (254 nm). La quantité d'Ac-β-Gly éluee est reportée en fonction de la quantité déposée.

b-2) Courbe de capacité des cartouches SPE

Les courbes reportant la quantité d'Ac-β-Gly recouvrée à l'étape d'élution en fonction de la quantité déposée sur la cartouche SPE (à volume de dépôt constant) permet d'évaluer la quantité maximale d'Ac-β-Gly retenue par le MIP (60 mg). Les courbes obtenues pour le MIP et le NIP sont reportées dans la figure II.13.

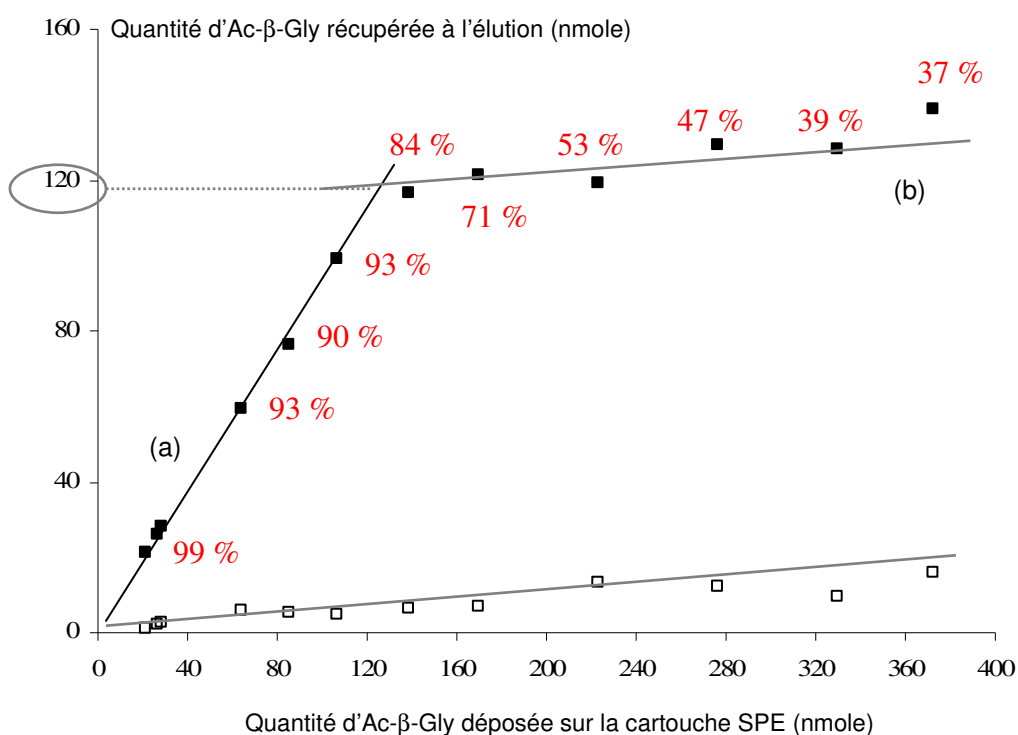


Figure II.13: Courbes de capacité obtenues par dépôt (V = 0,5 mL) de solutions d'Ac-β-Gly à des concentrations comprises entre 42 et 744 nmol/mL dans le chloroforme, sur deux cartouches SPE contenant respectivement 60 mg de MIP (■) et 60 mg de NIP (□). (n = 2)

Des recouvrements supérieurs à 90 % sont obtenus à l'élution du MIP pour des quantités d'Ac-β-Gly déposées sur la cartouche inférieures à 130 nmoles (les points expérimentaux ■ appartiennent à la droite (a) dont la pente est égale à 0,90 avec un coefficient de régression linéaire égal à 0,99). On suppose que les sites d'énergie élevée, à savoir les cavités les mieux

formées, sont majoritairement occupés et permettent la rétention totale de l'Ac- β -Gly au cours de l'étape de lavage. La quantité d'Ac- β -Gly retenue par le NIP jusqu'à l'élution est faible (\approx 2,5 nmoles). L'existence d'interactions non spécifiques mettant en jeu, pour un petit nombre d'entre elles, des énergies élevées explique l'élimination incomplète de l'Ac- β -Gly au cours du lavage.

En outre, la courbe relative à l'adsorption du MIP atteint un plateau (droite (b)) de saturation dès que la quantité d'Ac- β -Gly déposée sur la cartouche atteint 130 nmoles. La quantité de soluté alors retenue par le MIP est évaluée à 120 nmoles (et seulement 5 nmoles pour le NIP). On suppose alors que chaque empreinte du MIP est occupée par une molécule d'Ac- β -Gly. En tenant compte de la proportion molécule empreinte/monomère du protocole de synthèse du MIP, on s'attend à former 189 μ moles d'empreintes par gramme de polymère. Cependant, cette estimation est éloignée du résultat expérimental, puisque seulement 2 μ moles d'Ac- β -Gly sont retenues par gramme de MIP (120 nmoles / 60 mg \rightarrow 2 μ moles / g). Cet ordre de grandeur est comparable à celui obtenu avec d'autres MIPs préparés par voie non covalente dont les capacités prennent des valeurs comprises entre 1 et 40 μ moles par gramme de polymère [41-42]. Dans le cas présent, 1 % des empreintes théoriquement formées sont capables de capturer l'Ac- β -Gly.

Pour des quantités en Ac- β -Gly déposées supérieures à 160 nmoles, on relève une augmentation faible mais constante des quantités de soluté retenues par le MIP. La rétention persiste une fois que toutes les cavités sont saturées grâce aux interactions non spécifiques. L'excès de soluté retenu par le MIP jusqu'à l'étape d'élution augmente avec une pente équivalente à celle observée pour le NIP.

c) Réactivité croisée du polymère à empreintes moléculaires vis-à-vis de molécules appartenant à la famille des triterpènes

Après avoir démontré l'aptitude du MIP à reconnaître la molécule ciblée (Ac- β -Gly), nous avons déterminé la réactivité croisée vis-à-vis d'autres triterpènes de la famille des oléananes (**Figure II.14**).

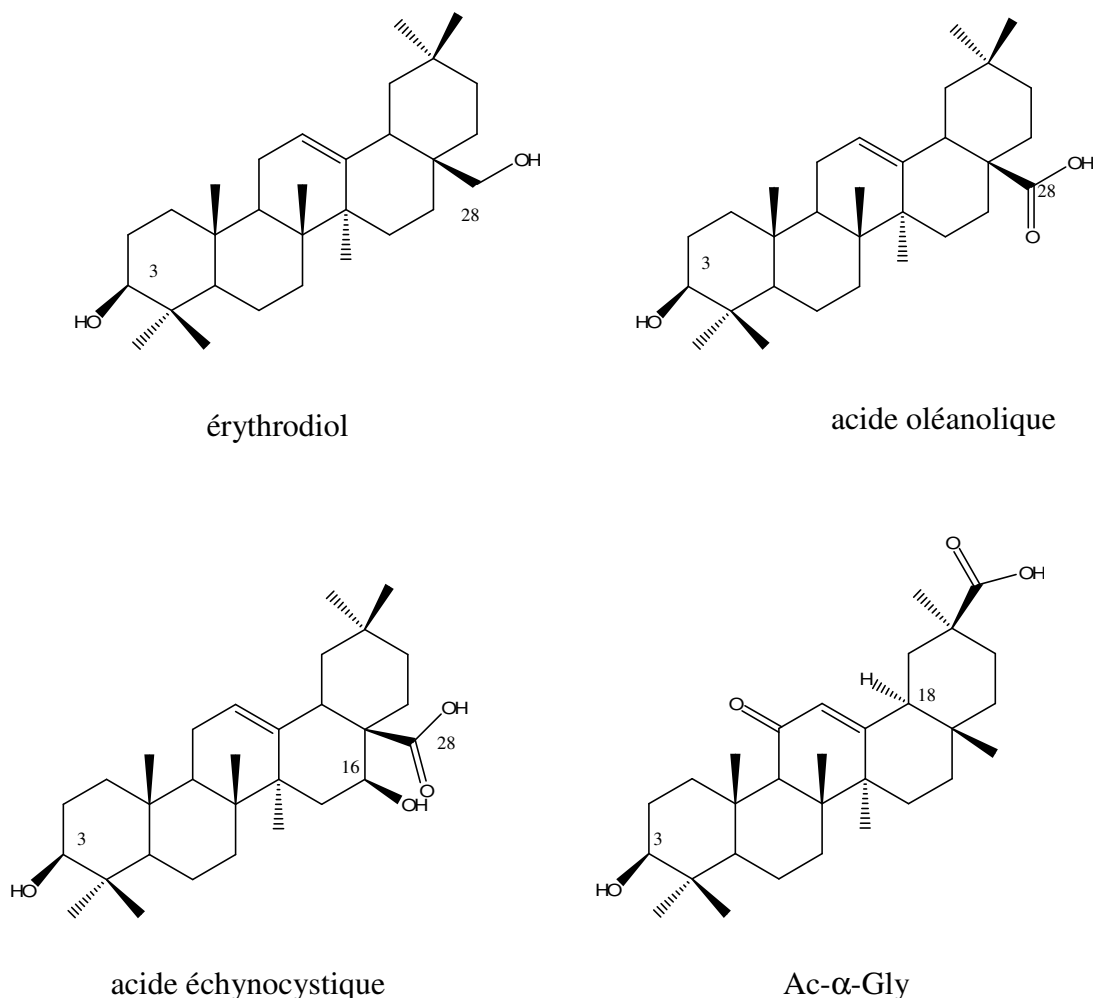


Figure II.14: Structure des molécules triterpéniques appartenant à la famille des oléananes.

Ces quatre dérivés triterpéniques présentent le même groupe hydroxyle en position 3. Les acides oléanolique et échynocystique ont une fonction acide carboxylique en position 28. L'érythrodiol et l'acide échynocystique ont un groupe hydroxyle en positions 28 et 16 respectivement. Seuls Ac- β -Gly et Ac- α -Gly présentent un groupe carbonyle. Le groupe hydroxyle en position 3 est spécifique du positionnement de l'acide méthacrylique dans l'empreinte (cf. **Figure II.11**). Les autres fonctions présentes dans la structure des acides oléanolique, échynocystique et dans celle de l'érythrodiol créent des interactions non spécifiques par des liaisons hydrogène avec le polymère. Le même protocole SPE que celui décrit dans le tableau II.4 a été appliqué aux quatre molécules triterpéniques. Les résultats sont reportés dans la figure II.15.

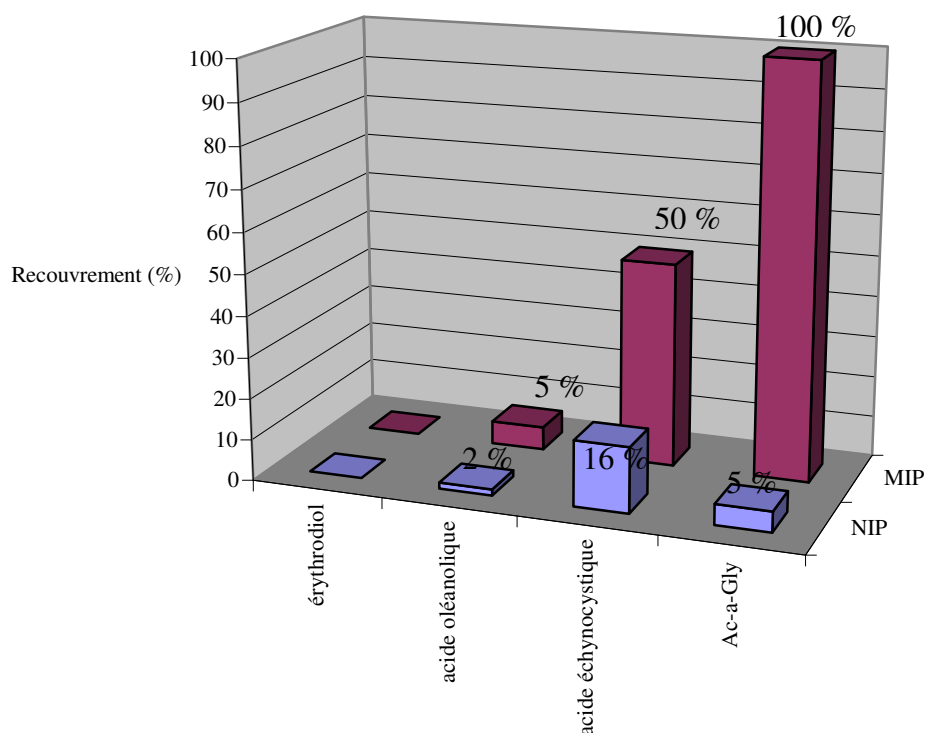


Figure II.15: Recouvrements obtenus à l'étape d'élution de la SPE appliquée au MIP et au NIP pour l'érythrodiol, l'acide oléanolique, l'acide échinocystique et l'Ac- α -Gly.

L'extraction est quantitative pour l'Ac- α -Gly avec une excellente sélectivité du MIP par rapport au NIP. Il n'en est pas de même pour les autres triterpènes dont les recouvrements à l'élution du MIP sont de 5 % pour l'acide oléanolique et nul pour l'érythrodiol.

Par contre, l'acide échinocystique est extrait à 50 % par le MIP avec une faible sélectivité du MIP par rapport au NIP. En effet, on retrouve 16 % de l'acide échinocystique déposé sur le NIP à l'étape d'élution. Ce résultat montre la présence d'interactions non spécifiques que le chloroforme ne peut éliminer totalement. On en conclut qu'une part non négligeable de la quantité d'acide échinocystique récupérée à l'élution du MIP a été retenue par des interactions non spécifiques.

L'orientation spatiale des groupes fonctionnels au sein des empreintes est un facteur important pour la reconnaissance des molécules par le MIP [43]. Dans le cas présent, on remarque les limites du MIP à reconnaître spécifiquement des molécules de squelette identique à celui de la molécule empreinte mais dont les groupes fonctionnels occupent des positions distinctes.

Ce MIP est dédié, dans la suite de ce travail, à l'extraction unique de l'Ac- β -Gly et de son épimère (Ac- α -Gly) et peut être qualifié de support spécifique d'extraction.

II.2.3. Application à l'analyse d'un extrait hydrolysé de racines de réglisse**a) Mise au point du protocole SPE**

Le précédent protocole SPE (**Tableau II.5**) a été appliqué à un extrait hydrolysé de racine de réglisse (Annexe VI). Toutefois, dans une expérience préliminaire, la matrice polaire n'ayant pas été totalement éliminée lors du lavage au chloroforme, ce dernier a été remplacé par l'acétonitrile. En effet, le fort pouvoir éluant de l'acétonitrile sur des molécules polaires déposées sur un MIP (monomère MAA) a déjà été démontré avec l'atrazine [44]. Les valeurs de polarité partielle (p_n) selon Snyder et Rohrschneider montrent que l'acétonitrile (p_n (ACN) = 2,436) est davantage apte à créer des interactions dipôle-dipôle fortes que ne l'est le chloroforme (p_n (CHCl₃) = 1,353) [45]. D'autre part, le caractère dissociant élevé de l'acétonitrile ($\epsilon_r = 37,5$) affaiblit les liaisons hydrogène existant entre les molécules interférentes ou recherchées et le polymère [46].

Lors de l'étape de lavage, le caractère éluant de l'acétonitrile et la trop faible masse (60 mg) de MIP ont entraîné une forte perte d'Ac- β -Gly. L'acétonitrile a donc un pouvoir éluant fort vis-à-vis de l'Ac- β -Gly. De plus, la reconnaissance de l'Ac- β -Gly par les empreintes n'est pas favorisée car l'acétonitrile n'est pas le solvant porogène. Aussi, une masse de 200 mg de MIP a été introduite dans la cartouche SPE de façon à augmenter le nombre de sites de rétention de l'Ac- β -Gly. Le nouveau protocole d'extraction est reporté dans le tableau II.6.

Etape	Composition du mélange	Volume (mL)
Conditionnement	1) MeOH	6
	2) ACN	12
Dépôt	Extrait hydrolysé de racine de réglisse (1 mg / 3 mL) dissous dans ACN	0,5
Lavage	ACN	1,5
Elution	MeOH	2

Tableau II.6: Protocole SPE sur MIP (200 mg) appliqué à un extrait hydrolysé de racine de réglisse.

Les chromatogrammes obtenus par CPL-UV (254 nm) pour l'analyse de l'extrait hydrolysé de racine de réglisse avant et après SPE sur MIP sont superposés dans la figure II.16.

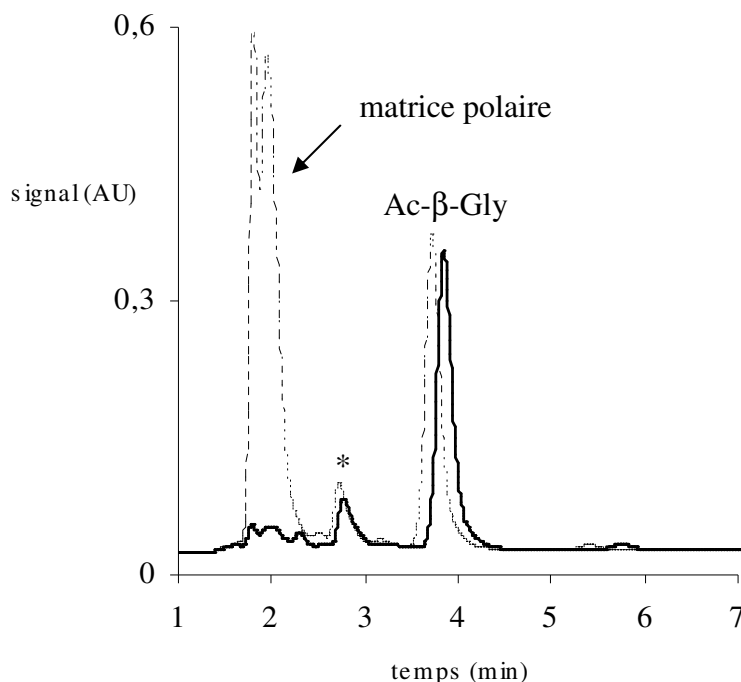


Figure II.16: Superposition des chromatogrammes obtenus pour l'analyse d'un extrait hydrolysé de racine de réglisse avant (pointillés) et après (trait plein) SPE sur MIP (* : pic non identifié). Analyse par CPL-UV (254 nm).

L'étape de lavage permet d'éliminer 93 % de la matrice polaire (valeur déterminée grâce à la mesure de l'aire du massif de la matrice (CPL-UV (220 nm)), résultat non présenté). L'étape d'élution donne un recouvrement de 98 % pour l'Ac-β-Gly. Ce résultat est très satisfaisant si on le compare à celui obtenu lors de la préparation d'un extrait de racine de réglisse sur cartouche HLB (recouvrement 77 %) [47].

b) Evaluation de la capacité du MIP pour la préparation d'un extrait hydrolysé de racines de réglisse

Nous avons évalué, dans le paragraphe II.2.2.b, la capacité du MIP à 2 μmole d'Ac-β-Gly par gramme à partir d'une solution standard d'Ac-β-Gly. Il convient de déterminer cette capacité en présence de la matrice contenue dans la racine de réglisse. Ainsi, un volume de 1,5 mL d'une solution d'extrait hydrolysé de racines de réglisse (1 mg, 3 mL ACN) est déposé sur deux cartouches SPE, d'une capacité volumique de 3 mL, et respectivement remplies de 200 mg de MIP et 200 mg de NIP. Les autres étapes du protocole sont identiques à celles reportées dans le tableau II.6. Chaque fraction est évaporée à sec sous azote et dissoute dans 0,5 mL de méthanol pour être analysée par CPL – UV (254 nm). Le tableau II.7 reporte les résultats obtenus.

Quantité d'Ac-β-Gly (nmole)	MIP	NIP
déposée	251,5	251,5
1) perdue au dépôt	$251,5 - 244,2 = 7,3$	$251,5 - 238,5 = 13$
2) perdue au lavage	107,4	206,4
3) éluee	139,7	39
Recouvrement global (%)	101	102,7

Tableau II.7: Bilan en quantité de matière pour l'Ac-β-Gly lors du protocole SPE appliqué au MIP et au NIP.

Les quantités d'Ac-β-Gly éluées par le méthanol (139,7 nmoles pour le MIP et 39 nmoles pour le NIP) montrent une capacité plus élevée pour le MIP que pour le NIP. Bien que le MIP et le NIP retiennent les mêmes quantités d'Ac-β-Gly lors du dépôt, une part importante (82 %) de la molécule recherchée est éluee du NIP au lavage.

L'essentiel des composés constituant la matrice est éliminé du MIP et du NIP au cours de l'étape de lavage (résultats obtenus par analyse CPL-UV à 220 nm, mais non montrés). Ceci prouve que la rétention matrice – polymère est principalement due à des interactions non spécifiques.

La quantité maximale d'Ac-β-Gly retenu spécifiquement par 200 mg de MIP est de 100,7 nmoles ($139,7 - 39$), soit $0,5 \mu\text{mol/g}$ de MIP avec un volume de dépôt de 1,5 mL. Ainsi, cette quantité spécifique retenue par le MIP est inférieure à la capacité obtenue avec une solution standard ($2 \mu\text{mol/g}$, dépôt et lavage au chloroforme). Tout en tenant compte de la différence de volume déposé sur la cartouche, supérieur à celui utilisé lors du tracé de la courbe de capacité (p.78), la diminution de la capacité du MIP est, en partie, imputée à l'effet matrice même si les constituants de cette dernière sont principalement retenus par des interactions non spécifiques. De plus, l'acétonitrile a un fort pouvoir éluant et n'est pas le solvant porogène du MIP, autant de facteurs peu favorables à la rétention de l'Ac-β-Gly par les empreintes du MIP.

II.2.4. Conclusion

Un MIP (monomère fonctionnel MAA) a été préparé pour l'extraction d'un triterpène, l'Ac-β-Gly appartenant à la famille des oléananes, dans un extrait de plante. Après optimisation du

protocole SPE, la réactivité du MIP vis-à-vis de quatre triterpènes de la même famille a été évaluée, démontrant l'importance de la position des groupes fonctionnels des solutés capables d'interagir avec les fonctions acide carboxylique de l'acide méthacrylique.

Ces résultats montrent que le MIP synthétisé est bien adapté à l'extraction spécifique de l'Ac- β -Gly et de son épimère.

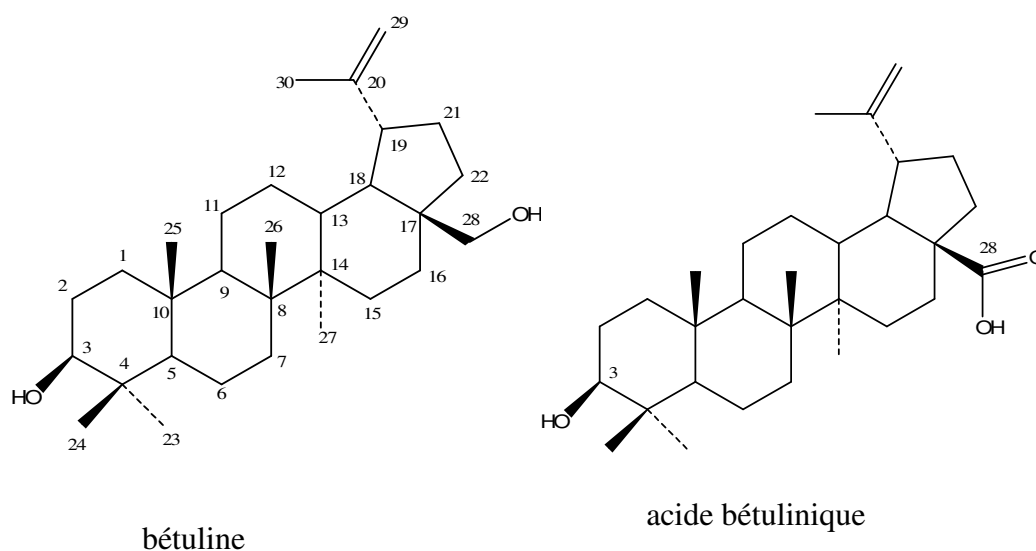
La détermination de la capacité du MIP pour une solution standard d'Ac- β -Gly et pour un extrait naturel a été réalisée. Le protocole SPE a été appliqué à un extrait hydrolysé de racine de réglisse avec un recouvrement très satisfaisant de 98 %.

II.3) PREPARATION ET EVALUATION D'UN POLYMERE A EMPREINTES MOLECULAIRES D'UN ALCOOL TRITERPENIQUE (Bétuline)

II.3.1. Choix des polymères à empreintes moléculaires pour l'extraction sélective de la bétuline et de ses dérivés lupanes

Au sein de la famille des triterpènes, la bétuline est le composé de structure lupane le plus abondant dans la nature, en particulier dans les écorces d'arbre. La bétuline et certains dérivés biosynthétiques tels que l'acide bétulinique, l'aldéhyde bétulinique, l'allobétuline et le lupéol (les formules sont indiquées dans la figure II.17) sont présents dans l'écorce de bouleau dont la teneur en bétuline est comprise entre 10 et 30 % [48]. Les composés lupanes ont des propriétés anti-inflammatoires, anti-cancéreuses et anti-virales qui donnent lieu à des études pharmacologiques et cosmétologiques [13].

Ainsi, l'acide bétulinique, principal triterpène présent dans l'écorce de platane, a été révélé par l'Institut National du Cancer des Etats-Unis comme un agent anti-tumoral [11]. Son activité cible les cellules malignes des mélanomes tout en laissant intactes les cellules saines [14]. Des recherches sont en cours pour élucider le mécanisme moléculaire exact d'action de l'acide bétulinique [13,49].



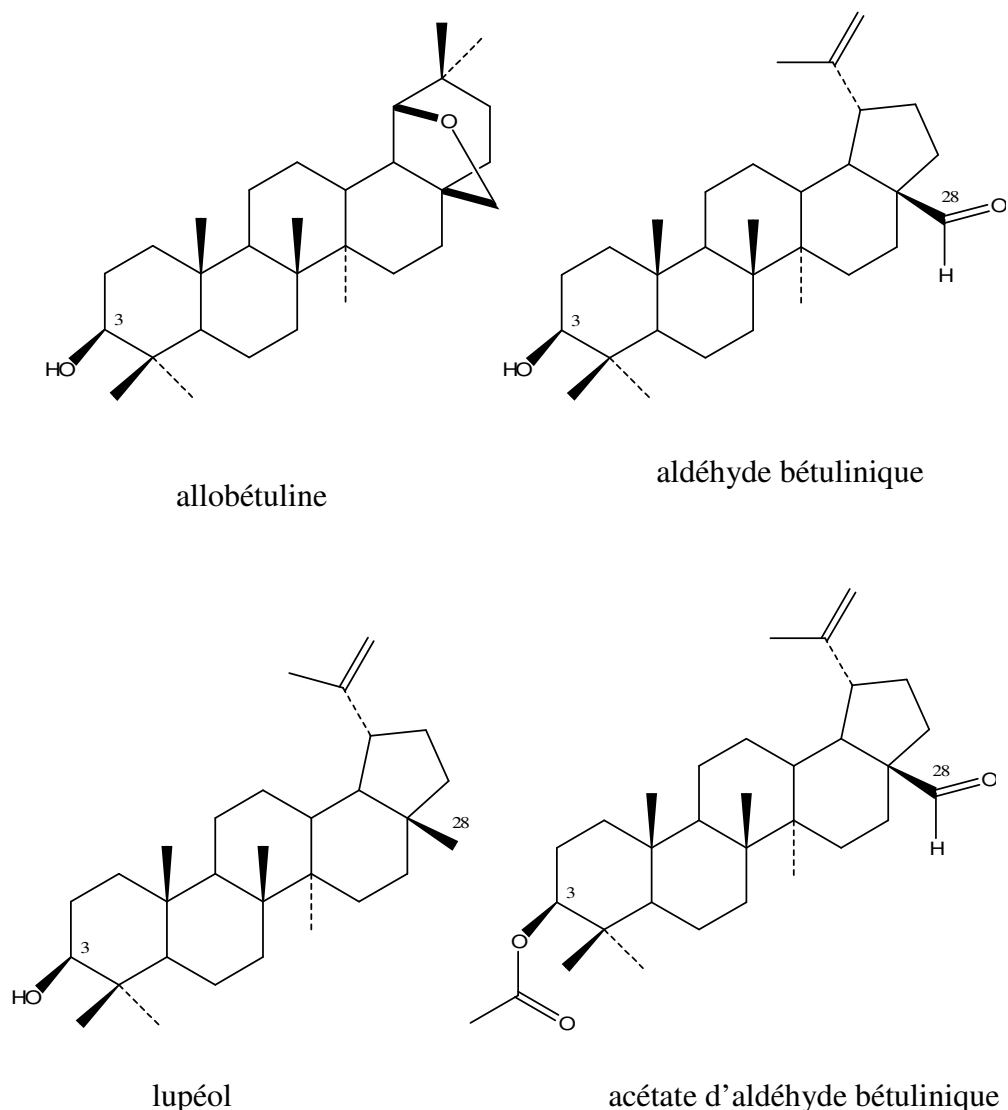


Figure II.17: Structure des principaux dérivés lupanes présents dans les écorces de bouleau et de platane.

Une analyse par CPG-SM d'un extrait d'écorces de platane a été réalisée après deux extractions SPE successives sur un support de phase inverse (Si-C₁₈) puis sur un support échangeur anionique fort (SAX). Les résultats ont été présentés en début de chapitre (paragraphe II.1.2.b). Les informations à retenir sont :

- 1- l'identification des triterpènes majoritaires (acide bétulinique, aldéhyde bétulinique et acétate d'aldéhyde bétulinique),
- 2- la co-extraction des triterpènes et des acides gras au cours de la première SPE (Si-C₁₈),
- 3- la séparation de la fraction des acides triterpéniques, acides gras de la fraction contenant des molécules non ionisables (fonctions alcool, ester et aldéhyde) par la seconde SPE (SAX).

Nous nous sommes intéressés à la faisabilité d'une extraction spécifique dans un végétal de la famille des lupanes (ionisables et neutres). Dans le cas de la réussite de cette démarche, il serait envisageable de réaliser des extractions sur un MIP à l'échelle semi-préparative pour des analyses ultérieures d'identification des triterpènes par RMN et SM. Cette réflexion s'appuie sur l'intérêt porté à la famille des lupanes par les phytochimistes dans la recherche de nouveaux principes actifs.

Un MIP a été synthétisé avec l'acide méthacrylique comme monomère fonctionnel et la bétuline comme molécule empreinte. La figure II.18 représente le schéma d'une empreinte.

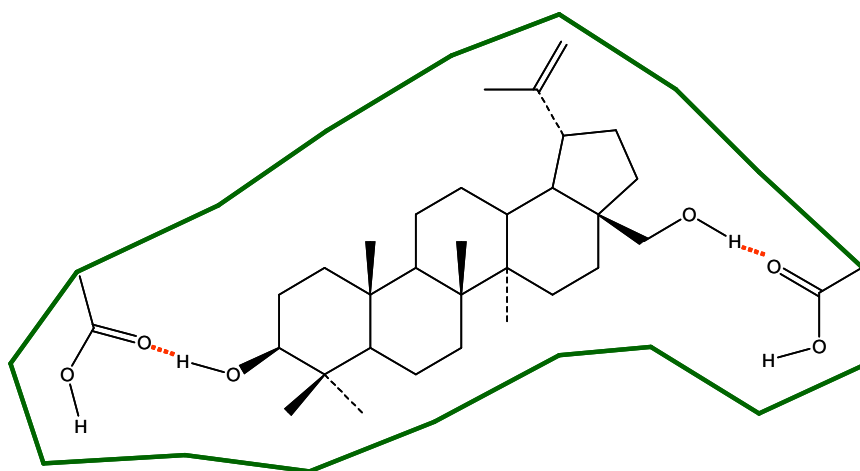


Figure II.18 : Schéma de l'empreinte formée autour de la bétuline dans le MIP. Liaisons hydrogène (■■■).

Les résultats de réactivité croisée obtenus avec le MIP–Ac- β -Gly ont montré l'importance de la position des groupes fonctionnels pour la reconnaissance de forme par les empreintes. Or, les deux groupes hydroxyle de la bétuline occupent des positions identiques à celles des fonctions acide carboxylique, aldéhyde, alcool ou encore ester des dérivés lupanes recherchés. Ainsi, l'empreinte formée devrait être propice à une recapture sélective de la famille dérivée de la bétuline, grâce aux liaisons hydrogène échangées avec le MAA.

La synthèse du MIP est reportée en annexe IV. La bétuline répond aux critères de choix d'une molécule empreinte puisque, d'une part cette dernière possède deux groupements échangeurs de liaisons hydrogène, et d'autre part la bétuline est disponible en quantités importantes et à un prix raisonnable en comparaison des autres composés de la famille des lupanes.

II.3.2. Etude de la réactivité croisée du MIP-bétuline vis-à-vis d'autres composés triterpéniques lupanes

a) Mise en place d'un protocole SPE sur le MIP-bétuline

L'optimisation des paramètres de la SPE (masse de MIP dans la cartouche, solvants de dépôt, de lavage et d'éluion) a été réalisée à partir d'une solution standard de bétuline.

Des expériences préliminaires ont indiqué qu'une masse importante de MIP était nécessaire pour éviter l'éluion prématurée de la bétuline au cours de l'étape de lavage. Ainsi, deux cartouches SPE (volume 3 mL) ont été remplies respectivement avec 500 mg de MIP et 500 mg de NIP. L'analyse des différentes fractions SPE est réalisée par CPL - UV (210 nm) (Annexe V).

b) Choix du chloroforme (solvant porogène) pour les étapes de dépôt et de lavage

Le protocole SPE appliqué à une solution standard de bétuline est reporté dans le tableau II.8.

Etape	Composition du mélange	Volume (mL)
Conditionnement	1) MeOH	6
	2) CHCl ₃	12
Dépôt	bétuline (50 µg/mL) dissoute dans CHCl ₃	0,5
Lavage	CHCl ₃	1
Elution	MeOH	3

Tableau II.8 : Protocole SPE sur MIP et NIP (500 mg) avec dépôt et lavage dans le chloroforme.

Les recouvrements obtenus sont présentés dans la figure II.19. La bétuline est récupérée à 79 % dans la phase d'éluion du MIP et à seulement 6 % dans celle du NIP.

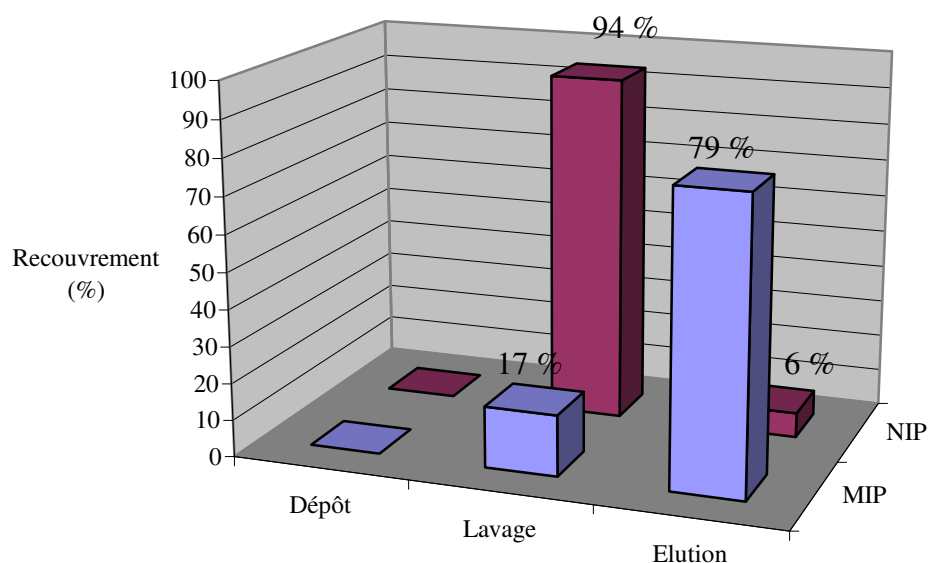


Figure II.19: Recouvrements de la bétuline obtenus au cours du protocole SPE appliqué au MIP et au NIP.

Le pourcentage de bétuline récupérée sur le NIP à l'issue de l'étape d'éluion (soit 6 %) représente le pourcentage d'interactions non spécifiques participant au mécanisme de rétention sur le MIP.

Le protocole du tableau II.8 est appliqué à deux autres triterpènes présents dans l'écorce de platane, l'acide bétulinique et l'acétate d'aldéhyde bétulinique, ainsi qu'à un acide gras, l'acide linoléique ($C_5H_{11}CH=CHCH_2CH=CHC_7H_{14}CO_2H$). Les recouvrements obtenus à l'éluion du MIP et du NIP sont reportés dans la figure II.20.

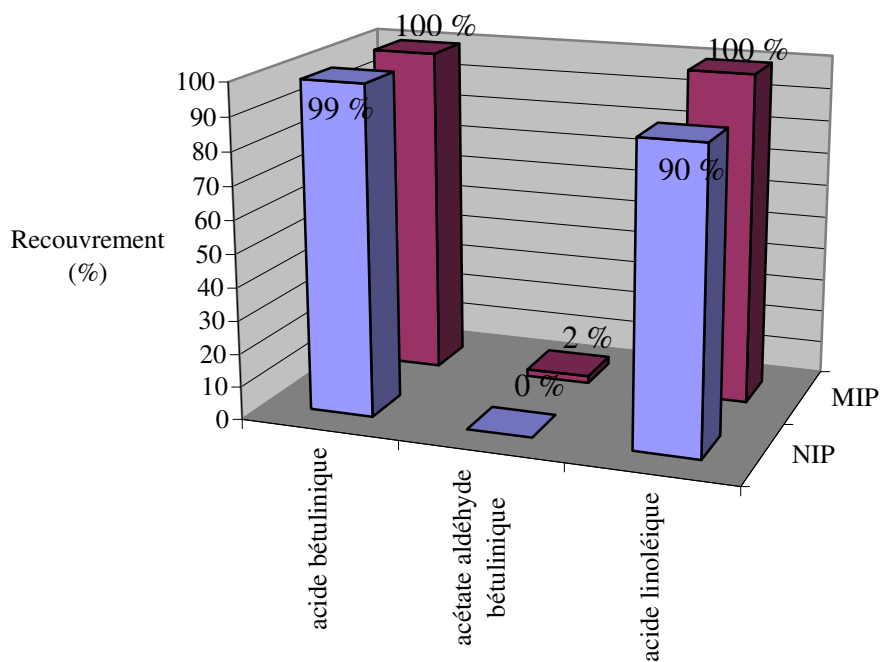


Figure II.20: Recouvrements de l'acide bétulinique, l'acétate d'aldéhyde bétulinique et l'acide linoléique obtenus à l'étape d'élution du protocole SPE appliqué au MIP et au NIP; dépôt et lavage dans le chloroforme.

Le recouvrement de l'acide bétulinique à l'élution du NIP est de 99 % prouvant l'incapacité du chloroforme à éliminer les interactions non spécifiques au cours de l'étape de lavage. Le recouvrement (100 %) à l'élution du MIP de l'acide linoléique (acide gras sans affinité spécifique pour les empreintes du MIP) confirme la présence de fortes interactions non spécifiques. Il s'avère que des interactions non spécifiques fortes ont déjà été observées par A.E.Rachkov avec des polymères préparés à partir de MAA dans le chloroforme [50]. L'auteur explique que le chloroforme, doté d'un caractère donneur de liaisons hydrogène, interagit avec le MAA au cours de la polymérisation, formant dans le polymère un grand nombre de résidus MAA exposés à interagir fortement avec les composés dotés de groupes donneurs et/ou accepteurs de liaisons hydrogène.

L'augmentation du volume de chloroforme (4 mL) à l'étape de lavage présente l'avantage d'éliminer totalement l'acide linoléique du MIP et l'acide bétulinique du NIP. Cependant, un tel protocole laisse entrevoir une diminution du rendement d'extraction de la bétuline par le MIP dans la mesure où 1 mL de chloroforme suffisait déjà à éliminer 17 % de cette dernière (**Figure II.19**).

D'autre part, l'acétate d'aldéhyde bétulinique est totalement éliminé du MIP et du NIP par le chloroforme (1 mL), indiquant qu'aucune liaison ne se forme entre le MAA et cet ester en présence de chloroforme. En effet, bien que les fonctions ester et aldéhyde créent des

interactions dipôle-dipôle avec MAA, elles ne sont pas capables de développer de liaisons hydrogène aussi fortes que des fonctions alcool ou acide carboxylique. Ces faits ont déjà été observés avec la famille des corticostéroïdes extraite spécifiquement par un MIP préparé avec du cortisol et MAA [51-53]. L'absence de rétention par les empreintes du MIP peut aussi être imputée à l'encombrement stérique de la fonction ester de l'acétate d'aldéhyde bétulinique.

En conclusion, le lavage au chloroforme ne permet pas d'atteindre l'objectif fixé consistant à retenir spécifiquement les triterpènes de la famille des lupanes au détriment des acides gras.

c) Etude de la réactivité croisée du MIP avec l'acétonitrile comme solvant de dépôt et de lavage

Afin d'établir un protocole capable de révéler la spécificité du MIP vis-à-vis des dérivés lupanes, le chloroforme a été remplacé par de l'acétonitrile au cours des étapes de dépôt et de lavage.

Le tableau II.9 contient les conditions expérimentales du protocole SPE. La figure II.21 reporte les recouvrements des molécules ciblées dans l'acétonitrile.

Etape	Composition du mélange	Volume (mL)
Conditionnement	1) MeOH	6
	2) ACN	12
Dépôt	soluté (triterpène ou acide gras) à 50 µg/mL dissous dans ACN	0,5
Lavage	ACN	3
Elution	MeOH	3

Tableau II.9 : Protocole SPE appliqué au MIP et au NIP (500 mg) avec dépôt et lavage dans l'acétonitrile.

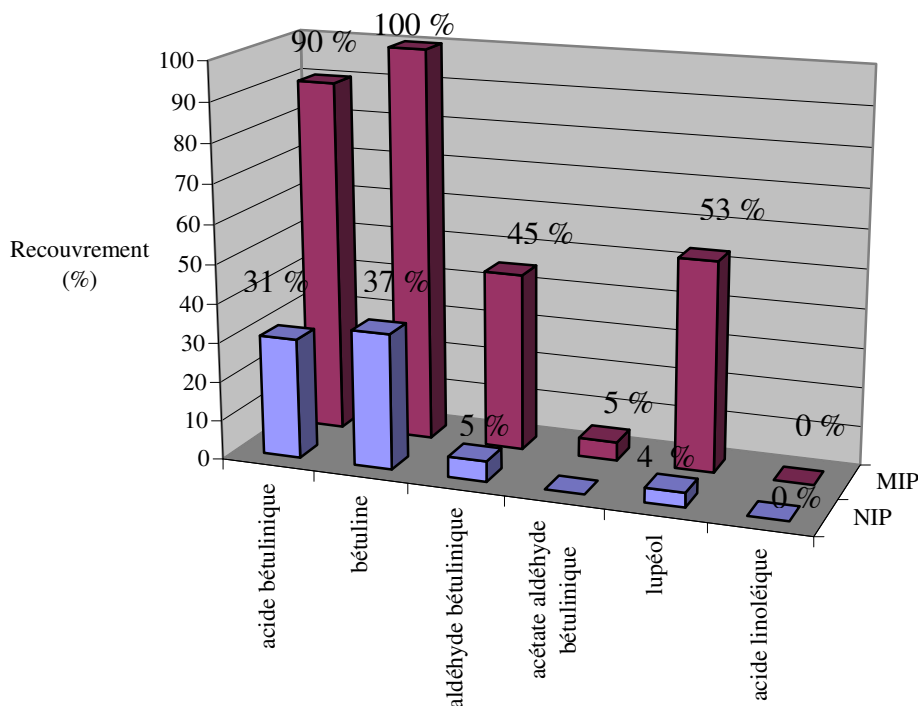


Figure II.21 : Recouvrements obtenus à l'étape d'éluion SPE du MIP et du NIP. Dépôt (0,5 mL) et lavage (3 mL) dans l'acétonitrile.

Comme attendu, l'acétonitrile favorise la rétention de la bétuline par le MIP puisque le recouvrement à l'éluion est de 100 % après un lavage avec 3 mL d'acétonitrile. Nous rappelons que le chloroforme a un pouvoir donneur de liaisons hydrogène supérieur à celui de l'acétonitrile. En revanche, l'acétonitrile a un caractère dissociant et polaire supérieur à celui du chloroforme [45]. Le passage du chloroforme à l'acétonitrile transforme les interactions existant entre les molécules et le polymère. Une sélectivité satisfaisante du MIP par rapport au NIP est vérifiée pour l'acide bétulinique, la bétuline, l'aldéhyde bétulinique et le lupéol confirmant le rôle de reconnaissance des empreintes vis-à-vis de ces molécules analogues. Le lupéol ne possède qu'un groupe hydroxyle, l'absence du deuxième point de fixation entraîne une diminution non seulement de la reconnaissance par les empreintes du MIP mais aussi de la rétention par le NIP au cours de l'étape de lavage. Les résultats obtenus avec l'aldéhyde bétulinique montrent que si ce deuxième point de fixation est une fonction aldéhyde, la rétention de la molécule d'intérêt sur le MIP et le NIP n'est que partielle au cours du lavage à l'acétonitrile.

En outre, le fractionnement des lavages (3 x 1 mL) indique une certaine sélectivité du MIP pour l'acétate d'aldéhyde bétulinique. En effet, 1 mL d'acétonitrile élimine 37 % de l'acétate d'aldéhyde bétulinique déposé sur le NIP et retient totalement le soluté sur le MIP. Malgré

l'encombrement stérique de la fonction ester, il existe une reconnaissance de la molécule par les empreintes.

Enfin, 2 mL d'acétonitrile suffisent à éluier totalement l'acide linoléique du MIP et du NIP. La reconnaissance de l'acide linoléique par les empreintes du MIP est inexistante dans la mesure où les profils d'éluition MIP et NIP sont identiques.

II.3.3. Conclusion

Un MIP de la bétuline a été préparé à partir de MAA dans le chloroforme.

Un protocole SPE établi à partir de 500 mg de MIP et du solvant porogène comme phase de lavage a montré une sélectivité du MIP satisfaisante vis-à-vis de la bétuline. Cependant, ce résultat n'a pas été retrouvé avec les autres triterpènes de la famille lupane.

Ainsi, un second protocole dans lequel le chloroforme a été remplacé par l'acétonitrile a été appliqué. Les recouvrements obtenus à l'éluition du MIP sont supérieurs à 90 % pour la bétuline et l'acide bétulinique. D'autre part, la fraction obtenue est exempte d'acides gras, ce résultat n'avait pas été atteint par le protocole de double SPE C₁₈ – SAX. Les rendements d'extraction du lupéol et de l'aldéhyde bétulinique sont de 50 % avec le MIP et inférieurs à 5 % avec le NIP indiquant une sélectivité satisfaisante du MIP pour la famille des lupanes. Seul l'acétate d'aldéhyde bétulinique ne vérifie pas la réactivité croisée du MIP-bétuline.

Les résultats obtenus sont encourageants pour l'extraction sélective de triterpènes lupanes d'une matrice végétale.

II.4) CONCLUSION MIPs TRITERPENES

Les triterpènes pentacycliques, appartenant à la famille des métabolites secondaires, sont des molécules hydrophobes avec quelques groupements fonctionnels à caractère donneur-accepteur de liaisons hydrogène. Le monomère, l'acide méthacrylique, a permis de créer des empreintes spécifiques à la molécule empreinte (Ac- β -Gly ou bétuline) par formation de liaisons hydrogène.

Des résultats positifs ont été obtenus pour chaque MIP en utilisant l'acétonitrile comme solvant de dépôt et de lavage. Le chloroforme, solvant porogène utilisé pour la synthèse des MIPs, est moins polaire que l'acétonitrile et ne permet pas une élimination suffisante des interactions non spécifiques.

Les résultats expérimentaux obtenus au cours de l'extraction d'une matrice végétale ont montré une grande spécificité du MIP-Ac- β -Gly pour sa molécule empreinte avec un rendement d'extraction de 98 %.

Le MIP-bétuline a révélé une réactivité croisée satisfaisante vis-à-vis des dérivés lupanes avec des recouvrements à l'élution du MIP supérieurs à 90 % pour la bétuline et l'acide bétulinique et de l'ordre de 50 % pour le lupéol et l'aldéhyde bétulinique.

Ces résultats sont favorables à l'utilisation de chacun de ces MIPs, à l'échelle analytique ainsi qu'à celle semi-préparative, en vue d'isoler des triterpènes pentacycliques oléananes et lupanes d'extraits végétaux.

Références bibliographiques du chapitre II

- [1] <http://Quasimodo.versailles-inra.fr>.
- [2] D.Baricevic, S.Sosa, R.Della Loggia, A.Tubaro, B.Simonovska, A.Krasna, A.Zupancic. *J.Ethnopharmacol.* 75 (2001) 125.
- [3] D.Wen, Y.Lin, W.Li, H.Lin. *J.Chromatogr.B* 812 (2004) 101.
- [4] V.Bilaloglu Guliyev, M.Gul, A.Yildirim. *J.Chromatogr.B* 812 (2004) 291.
- [5] C.Mathe, G.Culioli, P.Archier, C.Vieillescazes. *J.Chromatogr.A* 1023 (2004) 277.
- [6] M.Regert, J.M.Delacotte, M.Menu, P.Pétrequin, C.Rolando. *Ancient Biomolecules* 2 (1998) 81.
- [7] M.P.Colombini, F.Modugno, S.Giannarelli, R.Fuoco, M.Matteini. *Microchem. J.* 67 (2000) 385.
- [8] T.Akihisa, K.Yasukawa, H.Oinuma, Y.Kasahara, S.Yamanouchi, M.Takido, K.Kumaki, T.Tamura. *Phytochemistry* 43 (1996) 1255.
- [9] J.F.Cui. *Eur. J. of Pharmaceut. Sci.* 3 (1995) 77.
- [10] M.C.H.Tavares, J.H.Yariwaka Vilegas, F.M.Lanças. *Phytochem.Anal.* 12 (2001) 134.
- [11] T.Galgon, D.Höke, B.Dräger. *Phytochem.Anal.* 10 (1999) 187.
- [12] H.Budzikiewicz, J.M.Wilson, C.Djerassi. *J.Am.Chem.Soc.* 85 (1963) 3688.
- [13] J.Patocka. *J. Appl. Biomed.* 1 (2003) 7.
- [14] Y.G.Shin, K.H.Cho, S.M.Chung, J.Graham, T.K.Das Gupta, J.M. Pezzuto. *J.Chromatogr.B* 732 (1999) 331.
- [15] G.Takeoka, L.Dao, R.Teranishi, R.Wong, S.Flessa, L.Harden, R.Edwards. *J.Agric.Food Chem.* 48 (2000) 3437.
- [16] V.Castola, A.Bighelli, S.Rezzi, G.Melloni, S.Gladiali, J.M.Desjobert, J.Casanova. *Ind.Crops Products* 15 (2002) 15.
- [17] L.R.Snyder, J.J.Kirkland, J.L.Glajch. *Practical HPLC Method Development, Second Edition, Wiley-Interscience Publication* (1997).
- [18] B.H. de Oliveira, C.A.M.Santos, A.P.D.M.Espindola. *Phytochem.Anal.* 13 (2002) 95.
- [19] J.H.Chen, Z.H.Xia, R.X.Tan. *J.Pharm.Biomed.Anal.* 32 (2003) 1175.
- [20] B.Claude, Ph.Morin, M.Lafosse, P.André. *J.Chromatogr.A* 1049 (2004) 37.
- [21] B.Claude, N.Caussarieu, Ph.Morin, L.Morin-Allory, M.Lafosse. *J.Sep.Sci.* 27 (2004) 964.
- [22] T.Madl, H.Sterk, M.Mittelbach, G.N.Rechberger. *J.Am.Soc.Mass.Spectrom.* 17 (2006) 795.

- [23] K.He, G.F.Pauli, B.Zheng, H.Wang, N.Bai, T.Peng, M.Rollu, Q.Zheng. *J.Chromatogr.A* 1112 (2006) 24.
- [24] J.-L.Wolfender, S.Rodriguez, K.Hostettmann. *J.Chromatogr.A* 794 (1998) 299.
- [25] L.Suntornsuk. *J.Pharm.Biomed.Anal.* 27 (2002) 679.
- [26] G.Zhang, Y.Qi, Z.Lou, C.Lui, X.Wu, Y.Chai. *Biomed.Chromatogr.*19(7) (2005) 529.
- [27] Y.Hu, Y.Wang, G.Luo, W.We. *Analytical Letters* 33(2) (2000) 357.
- [28] S.Qi, L.Ding, K.Tian, X.Chen, Z.Hu. *J.Pharm.Biomed.Anal.* 40 (2006) 35.
- [29] Somenath Mitra. '*Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry*' – Wiley – Interscience (2003).
- [30] G.Janicsak, K.Veres, A.Z.Kakasy, I.Mathé. *Biochemical Systematics and Ecology* 34 (2006) 392.
- [31] M.C.Perez-Camino, A.Cert. *J.Agric.Food Chem.* 47 (1999) 1558.
- [32] V.Andrisano, D.Bonazzi, V.Cavrini, *J.Pharm.Bio.Analysis.* 13 (1995) 597.
- [33] M.Song, T.J.Hang, Y.Wang, L.Jiang, X.L.Wu, Z.Zhang, J.Shen, I.Zhang, *J. Pharm.Bio.Analysis* 40 (2006) 190.
- [34] F.G.M.Russel, S.van Uum, Y.Tan, P.Smits, *J.Chromatogr.B* 710 (1998) 223.
- [35] J.Xie, L.Zhu, H.Luo, L.Zhou, C.Li, X.Xu, *J.Chromatogr.A* 934 (2001) 1.
- [36] L.Zhu, X.Xu, *J.Chromatogr.A* 991 (2003) 151.
- [37] K.Yoshizako, K.Hosoya, Y.Iwakoshi, K.Kimata, N.Tanaka, *Anal.Chem.* 70 (1998) 386.
- [38] D.Spivak, M.A.Gilmore, K.J.Shea, *J.Am.Chem.Soc.* 119 (1997) 4388.
- [39] C.Yu, K.Mosbach, *J.Chromatogr.A* 888 (2000) 63.
- [40] Q.Z.Zhu, K.Haupt, D.Knopp, R.Niesser, *Anal.Chim. Acta* 468 (2002) 217.
- [41] K.Ensif, C.Berggren, R.E.Majors, *LC-GC Europe* 3 (2002) 2.
- [42] F.Chapuis, V.Pichon, F.Lanza, B.Sellergren, M-C.Hennion, *J.Chromatogr.B* 804 (2004) 93.
- [43] Y.Lu, C.Li, X.Liu, W.Huang, *J.Chromatogr.A* 950 (2002) 89.
- [44] M.T.Muldoon, L.H.Stanker, *Anal.Chem.* 69 (1997) 803.
- [45] R.Rosset, M.Caude, A.Jardy, *Chromatographies en phase liquide et supercritique.* Masson, Paris, 3rd ed. (1991).
- [46] M.M.Ariffin, E.I.Miller, P.A.G.Cormak, R.A.Anderson. *Anal. Chem.* 79 (2007) 256.
- [47] C.Sabbioni, R.Mandrioli, A.Ferranti, F.Bugamelli, M.Addolorata Saracino, G.Cantelli Forti, S.Fanali, M.Augusta Raggi, *J.Chromatogr.A* 1081 (2005) 65.

- [48] I.Habiyaremye, T. Stevanovic-Janezic, B.Riedl, F-X.Garneau, F-I.Jean. *Journal of Wood Chemistry and Technology* 22 (2002) 83.
- [49] I.Baglin, A-C.Mitaine-Offer, M.Nour, K.Tran, C.Cavé, M.-A.Lacaille-Dubois. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* 3 (2003) 159.
- [50] A.E.Rachkov, S-HCheong, A.V.El'skaya, K.Yano, I.Karube. *Polym.Adv.Technol.* 9 (1998) 511.
- [51] O.Ramström, L.Ye, K.Mosbach. *Chemistry & Biology* 3 (1996) 471.
- [52] S-H.Cheong, A.E.Rachkov, J-K.Park, K.Yano, I.Karube. *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry* 36 (1998) 1725.
- [53] C.Baggiani, G.Giraudi, F.Trotta, C.Giovannoli, A.Vanni. *Talanta* 51 (2000) 71.
- [54] B.Büchele, W.Zugmaier, T.Simmet. *J.Chromatogr.B* 791 (2003) 21.

Chapitre III

Application des polymères à empreintes moléculaires au clean-up
d'un échantillon aqueux : cas d'un dopant dans les urines

III.1) ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE DE L'ANALYSE DE MOLECULES ET DE LEURS METABOLITES DANS LES URINES

III.1.1. Présentation générale du dopage sportif

a) Principales familles de molécules dopantes

Dans le code de Santé Publique du 23 Mars 1999, le dopage est décrit de la façon suivante :

‘‘ Le dopage est défini par la loi comme l'utilisation de substances ou de procédés de nature à modifier artificiellement les capacités d'un sportif. Font également partie du dopage les utilisations de produits ou de procédés destinés à masquer l'emploi de produits dopants...’’

Les règlements (code mondial antidopage, décrets...) sont édités par la WADA (World Anti-Doping Agency). Les fédérations internationales diligentent les contrôles réalisés dans les laboratoires antidopage tels que le département des analyses de l'agence française de lutte contre le dopage (afld). Les décisions sont prises par les fédérations nationales.

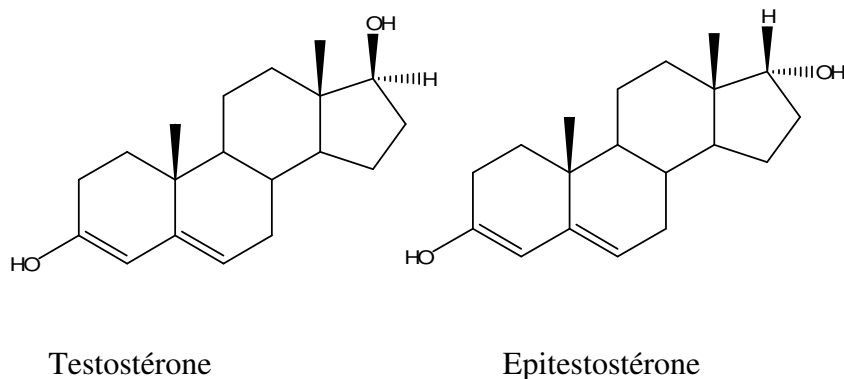
La majorité des analyses sont réalisées sur les urines conservées à -18°C . Une procédure de dépistage rapide (« screening ») permet tout d'abord de repérer les échantillons pour lesquels il y a suspicion de dopage. Puis, des méthodes spécifiques aux grandes familles de produits dopants sont mises en place. Environ 10 % des échantillons issus de l'étape de screening subissent une étape complémentaire dite « de confirmation ». Les autres sont déclarés négatifs. Les produits dopants sont répartis dans différentes familles que nous allons décrire en les illustrant avec quelques exemples [1].

1) Les anabolisants:

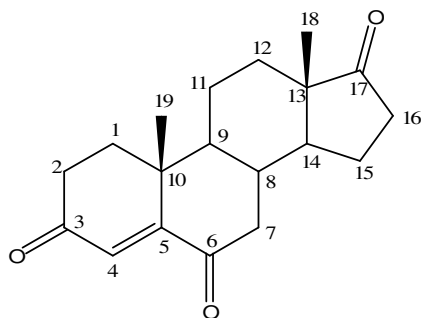
Les anabolisants sont définis comme des substances favorisant les phénomènes d'assimilation chez les êtres vivants. La prise d'anabolisants favorise le développement des muscles et la prise de poids. Parmi les anabolisants les plus couramment pris par les sportifs, on trouve les dérivés de la testostérone, la nandrolone et le stanozolol.

Prenons l'exemple de la testostérone, hormone sexuelle mâle endogène, qui constitue, sous sa forme synthétique, un anabolisant. La testostérone endogène est présente dans les urines à des concentrations variables selon les individus et la prise d'hormone synthétique s'avère difficile à déceler. Le contrôle est réalisé par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse après formation d'un dérivé silylé volatil. Les anomalies sont détectées grâce à la mesure du rapport de la concentration en testostérone sur la concentration en épitestostérone (l'épitestostérone est un épimère endogène de la testostérone qui

accompagne la biosynthèse de la testostérone). La spectrométrie de masse à rapport isotopique (IRMS), couplée à la chromatographie en phase gazeuse, est un outil supplémentaire pour la confirmation de dopage par la testostérone [2-3]. Ces composés stéroïdiens se retrouvent sous formes glucuro- ou sulfo-conjuguées dans les urines. Lors de la préparation d'échantillon, une étape d'hydrolyse permet de libérer la forme libre de la molécule (Annexe XV).



La chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse est aussi un moyen d'investigation puissant pour l'analyse des anabolisants. Elle a ainsi permis de quantifier les métabolites urinaires d'un anabolisant stéroïdien (androst-4-ène-3,6,17-trione) présent dans des compléments alimentaires [4].

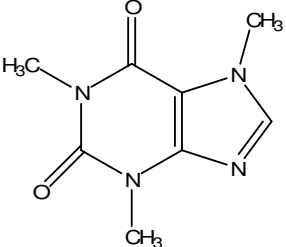
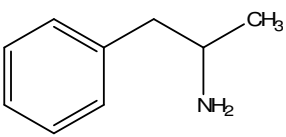
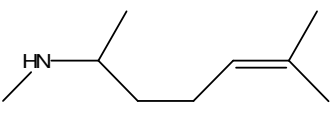
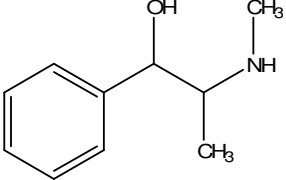
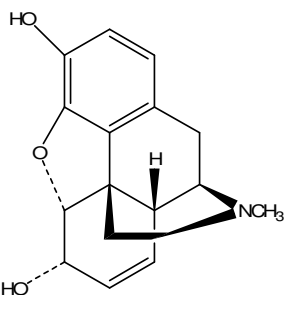


Androst-4-ène-3,6,17-trione

D'autres composés tels que les β -agonistes (ex: terbutaline), retrouvés dans les médicaments antiasthmatiques, sont considérés, à très forte dose, comme anabolisants. Ils sont analysés suivant le protocole mis en place pour les β -bloquants dont les caractéristiques chimiques sont proches.

2) Les stimulants, narcotiques et β -bloquants:

Ces trois familles de composés ont des effets dynamisant ou calmant. Ces bases azotées sont excrétées dans les urines en présence de leurs métabolites, sous forme libre ou conjuguée. Elles sont, comme la majorité des produits dopants, des principes actifs de médicaments. La plupart sont strictement interdites, d'autres telles que les éphédrines, le cannabis et la morphine ne sont considérées comme produits dopants qu'à partir d'un certain seuil de concentration (**Tableau III.1**).

Substance contrôlée	Molécule	Caractère dopant	Seuil ($\mu\text{g/mL}$)
Caféine		stimulant	12
Amphétamine		stimulant	0 (La simple présence suffit.)
Isométhéptène [5]		stimulant	0 (Interdit en période de compétition seulement.)
Ephédrine [6]		stimulant	10
Morphine		narcotique	1

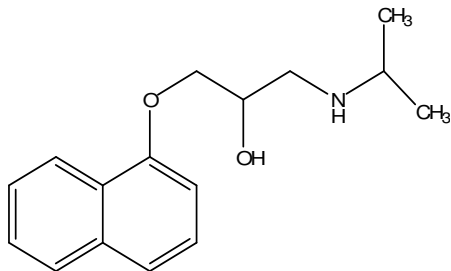
Propranolol		β-bloquant	<p>0 (Prohibé dans certains sports uniquement. Dans ce cas, la simple présence suffit.)</p>
-------------	---	------------	---

Tableau III.1 : Exemples de stimulants, narcotique et β-bloquant (source : <http://www.wada-ama.org>).

Les molécules présentes dans les urines sous forme libre sont analysées par chromatographie en phase gazeuse avec un détecteur thermoionique (détecteur spécifique aux molécules azotées et phosphorées) ou par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse, après dérivation dans le cas de molécules non volatiles. L'analyse des métabolites conjugués nécessite une étape préalable d'hydrolyse.

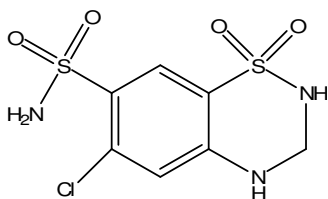
3) Les diurétiques:

Les diurétiques sont utilisés comme agents masquants. Ils augmentent la diurèse et permettent non seulement de diluer l'urine mais aussi d'éliminer rapidement les agents dopants et leurs métabolites. Ils limitent ainsi la durée de détectabilité des produits dopants dans les urines. Ils sont aussi capables de provoquer une perte de poids rapide, entraînant des changements de catégories favorables à certains sportifs lors de compétitions. La prise de diurétiques est donc interdite.

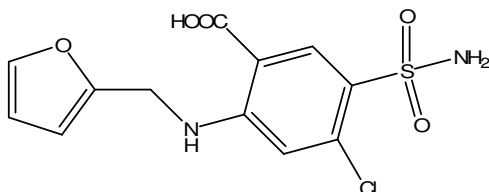
Parmi les diurétiques, on trouve des molécules de propriétés chimiques très différentes. Ils sont généralement excrétés sous leur forme originelle. La majorité de ces molécules étant polaires, elles ne peuvent être analysées par chromatographie en phase gazeuse qu'après méthylation. Cependant, leur instabilité thermique rend ce type d'analyse peu fréquent. La chromatographie en phase liquide est plus largement décrite comme méthode d'analyse des diurétiques. Une préparation d'échantillon par extraction liquide-liquide ou extraction solide-liquide s'avère nécessaire afin d'extraire sélectivement ces molécules polaires de la matrice aqueuse de l'urine.

Parmi les diurétiques utilisés, on retrouve des sulfonamides, agents bactériostatiques (substances arrêtant le développement des bactéries sans les tuer), comme :

- l'hydrochlorothiazide



- la furosémide :

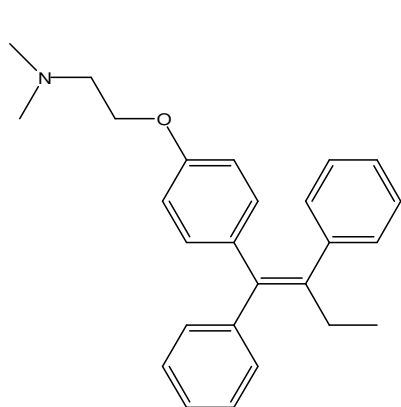


Ces quelques exemples de produits dopants constituent une liste non exhaustive. En revanche, ils permettent d'apporter des informations importantes concernant la démarche suivie, dans le cadre de la lutte contre le dopage, par les institutions et les laboratoires d'analyse.

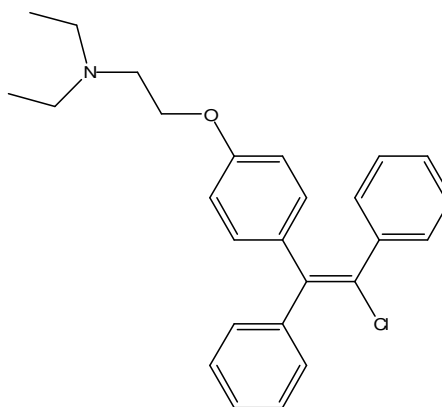
b) Cas particulier des anti-oestrogènes (tamoxifène et clomiphène)

Le citrate de tamoxifène est commercialisé par AstraZeneca sous le nom de Novaldex (ou encore Istubal, Voladex, selon les pays), produit vendu dans le monde entier pour le traitement du cancer du sein. En 1998, l'organisme Food and Drug Administration a reconnu le rôle du tamoxifène dans la réduction de cancers du sein déclarés chez les femmes à risque élevé. Toutefois, le tamoxifène est aussi connu pour son caractère cancérigène, notamment au niveau de l'utérus [7].

Bien que le tamoxifène soit usuellement prescrit chez la femme, des métabolites de ce principe actif ont été retrouvés dans les urines d'hommes, athlètes de haut niveau. En effet, le caractère anti-œstrogène du tamoxifène peut à la fois remplacer la prise d'anabolisants et diminuer les effets secondaires de la prise excessive d'anabolisants androgènes stéroïdiens. Le tamoxifène et ses analogues (clomiphène) ont été interdits par la WADA en janvier 2000.

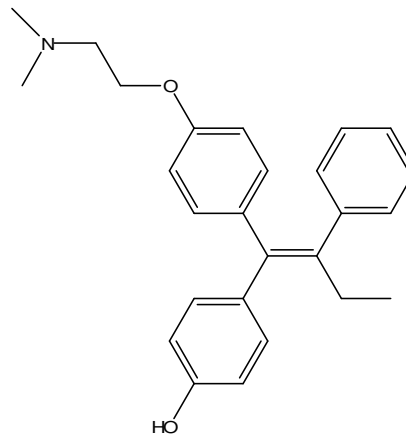
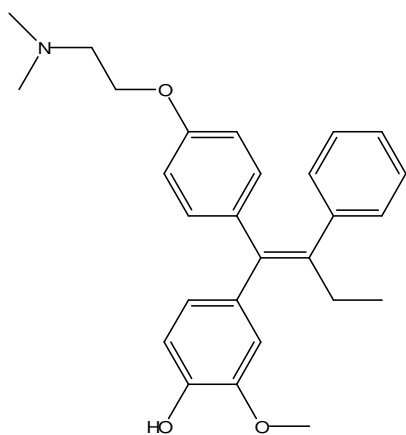


Tamoxifène



Clomiphène

Dans les différents laboratoires de dépistage du dopage, le tamoxifène et ses métabolites sont analysés dans les urines par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse après silylation [8]. Les métabolites du tamoxifène retrouvés dans l'urine sont à 95 % sous forme glucuro-conjuguée [9]. Les deux principaux métabolites identifiés sous leur forme libre sont le 4-hydroxytamoxifène (métabolite B) et le 4-hydroxy-3-méthoxytamoxifène (métabolite C).



4-hydroxy-3-méthoxytamoxifène (métabolite C) 4-hydroxytamoxifène (métabolites B)

Cependant, d'autres métabolites issus de la carboxylation ou de la déméthylation du tamoxifène ont été identifiés [10-11]. Les métabolites du tamoxifène sont présents en très faibles quantités dans l'urine, l'élimination principale ayant lieu par les fèces.

III.1.2. Méthodes d'analyse du tamoxifène dans les fluides biologiques

Ces dix dernières années, la littérature a fréquemment traité de l'analyse du tamoxifène et de ses métabolites. Nous aborderons tout d'abord la chromatographie en phase liquide puis la chromatographie en phase gazeuse et enfin l'électrophorèse capillaire comme méthodes d'analyse des métabolites du tamoxifène (Annexe IX).

a) Chromatographie en phase liquide

La chromatographie en phase liquide est appréciée pour sa simplicité d'utilisation et pour son caractère universel. Elle est en effet capable d'analyser des molécules de masse et de polarité très différentes grâce à la grande diversité de phases stationnaires mises sur le marché. La sélectivité et l'efficacité des colonnes récentes offrent un potentiel d'investigation élevé. Le couplage de la chromatographie en phase liquide à des systèmes de détection tels que la spectrométrie d'absorption UV, la fluorimétrie ou la spectrométrie de masse permet de répondre à des exigences de sélectivité et de sensibilité.

a-1. Détecteurs non informatifs

a-1-1) absorption UV

Le détecteur spectrométrique d'absorption UV émet un faisceau monochromatique traversant une cellule à l'intérieur de laquelle circule la phase mobile sortant de la colonne. Les intensités reçues (I_0) et transmises (I) par la phase mobile sont mesurées par deux photodiodes et converties en absorbance A .

$$A = \log (I_0 / I) \quad \text{[III.1]}$$

La loi de Beer-Lambert indique que A est fonction de la concentration C et du caractère chromophore ϵ_λ des espèces présentes dans la phase mobile.

$$A = \epsilon_\lambda \cdot l \cdot C \quad \text{[III.2]}$$

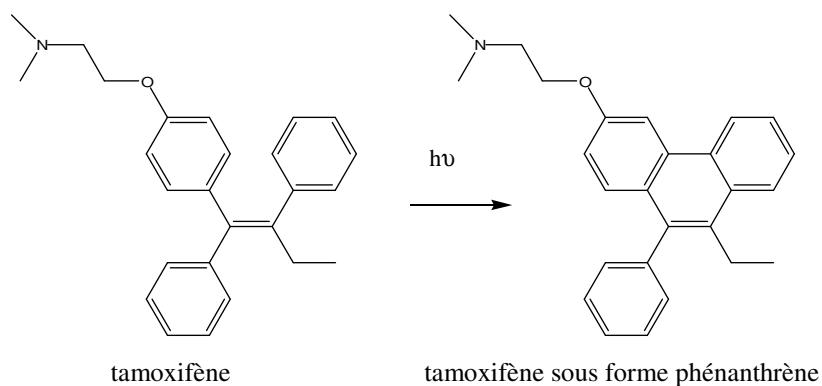
Le coefficient d'absorption molaire conditionne la sensibilité de la détection [12]. Or, le tamoxifène et ses métabolites présentent des valeurs de ϵ_λ ($\epsilon_{204} \approx 39\,500$) relativement élevées puisque ces molécules contiennent trois noyaux benzéniques fixés sur la même liaison éthylénique, formant ainsi un système de liaisons π conjuguées. Le spectre d'absorption UV du tamoxifène réalisé dans le méthanol est caractérisé par deux maxima d'absorption situés respectivement à 238 et 278 nm, chacun d'eux correspondant à des transitions π - π^* (Annexe XI). L'absorption aux environs de 240 nm est supérieure à celle observée vers 280 nm ($\epsilon_{238} \approx 18\,800$, $\epsilon_{278} \approx 11\,800$). De précédents travaux (**Tableau III.2**) confirment le choix de 240 nm

comme longueur d'onde de détection en chromatographie en phase liquide [13] ; dans ce cas, une limite de détection de 2 ng/mL (40 pg injectés) est obtenue pour le dosage du tamoxifène et de deux de ses métabolites [14]. La détection UV est dix fois moins sensible que la détection par fluorimétrie et par spectrométrie de masse tandem.

Enfin, un détecteur à barrette de diodes a permis le suivi de la décomposition enzymatique du tamoxifène [13].

a-1-2) fluorimétrie

Une molécule fluoresce lorsqu'elle est capable d'émettre un rayonnement électromagnétique à une longueur d'onde $\lambda_{\text{ém}}$, après excitation par un rayonnement UV de longueur d'onde λ_{exc} . La détection par fluorimétrie consiste alors à mesurer l'intensité du rayonnement électromagnétique émis à $\lambda_{\text{ém}}$. L'absence de groupements fluorophores dans la molécule de tamoxifène limite l'intérêt de la détection fluorimétrique. Cette difficulté a été contournée par la transformation post-colonne du tamoxifène et de ses métabolites (B, X et BX) en phénanthrènes dans un réacteur photochimique [16-18].



Ce mode de détection est à la fois sensible et sélectif pour le dosage du tamoxifène et de ses métabolites présents à l'état de traces dans des matrices complexes [16]. Des limites de quantification comprises entre 0,24 et 14 ng/mL ont été obtenues pour les métabolites du tamoxifène [17] ; ces valeurs sont comparables à celles obtenues en CPL-SM/SM [19]. La détection par fluorescence a été utilisée lors d'études pharmacocinétiques avec les mêmes valeurs de λ_{exc} et $\lambda_{\text{ém}}$ pour tous les métabolites du tamoxifène [17]. Les caractéristiques chromatographiques relatives aux résultats précédents sont reportées dans le tableau III.3.

Molécules (Annexe IX)	Matrice	Préparation de l'échantillon	Conditions chromatographiques	Détection	Commentaires	Réf.
tamoxifène suivi d'une réaction d'hydroxylation par voie enzymatique	standard	aucune	- colonne: Waters Symmetry C ₁₈ 150 mm x 4,5 mm (5 µm) - phase mobile : ACN/AcOH-TEA (pH 7,4) (gradient) - durée: 25 min.	λ_{dét} = 240 nm	LOD = 5 ng.	[13]
métabolite : 4- hydroxytamoxifène (B)	standard	aucune	- colonne: Higgin Analytical Targa C ₁₈ 10 cm x 300 µm (5 µm) - phase mobile : ACN/0,1% HCOOH _(aq) (gradient) - Vol.inj. = 1 µL - D = 800 µL/min, split → 3µL/min - durée : 10 min.	λ_{dét} = 280 nm		[15]
tamoxifène métabolites : 4- hydroxytamoxifène (B) N-démethyltamoxifène (X)	plasma humain	SPE cartouche C ₂ –Bond Elut (VARIAN) recouvrements : 59 – 63 %	- colonne : µBondapak C ₁₈ - Vol.inj. = 20 µL - durée : 12 min.	λ_{dét} = 240 nm	linéarité : 0,002 – 2 µg/mL LOD = 2 ng/mL (40 pg) validation	[14]

Tableau III.2 : Analyse du tamoxifène et de ses métabolites par chromatographie en phase liquide-absorption UV.

Molécules (Annexe IX)	Matrice	Préparation de l'échantillon	Conditions chromatographiques	Détection (marque fournisseur)	Commentaires	Réf.
tamoxifène métabolites : N-démethyltamoxifène (X) 4-hydroxytamoxifène (B) 4-hydroxy-N-démethyltamoxifène (BX)	plasma humain	LLE plasma (1 mL) / hexane-alcool isopropylique 95- 5% (6 mL)	- colonne: silice greffée cyano (Rexchrom ; Regis Chemical) 250 mm x 4,6 mm (5 µm) - phase mobile : ACN / tampon phosphate de potassium (20 mM, pH 3) - durée : 60 min	- fluorescence (Groton Technology, Concord, USA) $\lambda_{exc.} = 256 \text{ nm}$ $\lambda_{ém.} = 380 \text{ nm}$ - dérivation post-colonne par voie photochimique (Astec, Advanced separation Technologies, Whippany, NT, USA)	LOQ (ng/mL): (tam) = 14 (X) = 14 (B) = 0,24 (BX) = 0,6	[17]
tamoxifène (Z et E) métabolites: 4-hydroxytamoxifène (B) métabolite Y N-démethyltamoxifène (X)	sérum de cheval	LLE sérum (2 mL) / diethylether (20 mL)	- colonne: silice greffée C ₁₈ (Hichrom ODS1) 250 mm x 4,6 mm (5 µm) - phase mobile: MeOH / ACN / TFA (pH 2,9) - durée: 10 min	- fluorescence (Hewlett Packard, Waldbrown, Germany) $\lambda_{exc.} = 254 \text{ nm}$ $\lambda_{ém.} = 360 \text{ nm}$ dérivation post-colonne par voie photochimique ($\lambda = 254 \text{ nm}$)	LOQ (ng/mL): (tam) = 37,1	[18]
tamoxifène	standard	aucune	- colonne : silice greffée C ₁₈ (Radial Pak 8 MBC18) 100 mm x 8 mm (10 µm) - ACN / AcONH ₄ (100 mM, pH 5) (gradient)	- fluorescence (Shimadzu 530 RF) $\lambda_{exc.} = 260 \text{ nm}$ $\lambda_{ém.} = 375 \text{ nm}$ - dérivation post-colonne par voie photochimique (Aura Industries Inc.) ($\lambda = 254 \text{ nm}$)		[16]

Tableau III. 3 : Analyse du tamoxifène et de ses métabolites par chromatographie en phase liquide-fluorescence.

a-2. Détecteur informatif

Le couplage de la chromatographie en phase liquide à la spectrométrie de masse est une méthode de choix pour identifier et quantifier les métabolites du tamoxifène. Le principe de l'appareillage est rappelé dans l'annexe XVII.

La chromatographie en phase liquide (HPLC, UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography), CLC (Capillary Liquid Chromatography)) a été couplée à la spectrométrie de masse, en mode d'ionisation ESI, pour identifier et quantifier le tamoxifène et ses métabolites dans des matrices biologiques (**Tableau III.4**).

Les résultats publiés aboutissent aux conclusions suivantes :

1- Identification de quelques métabolites du tamoxifène (B, D et BX) par SM/SM [20,23].

2- Dosage de quatre métabolites du tamoxifène (B, X, Z et N-oxyde tamoxifène) par MRM. Le couplage de la SM à une colonne de diamètre interne 4,6 mm a apporté des valeurs de LOQ comprises entre 0,25 et 1 ng/mL [19]. Le signal obtenu en mode ESI étant proportionnel à la concentration en soluté sortant de la colonne, une nette diminution des LOQ a été observée avec les faibles diamètres des colonnes utilisées en CLC (LOQ = 0,1 ng/mL pour le 4-hydroxytamoxifène) [15]. D'autre part, le dosage de métabolites (B et Z) du tamoxifène est dix fois plus sensible en UPLC qu'en HPLC [21].

3- La linéarité du signal est vérifiée sur 3 décades, avec une pondération de la droite d'étalonnage en $1/x^2$ [15,22].

4- Il est possible de réduire la durée des analyses (3 – 5 min) par :

- un débit élevé (4 mL/min) avec une colonne monolithe [22],
- une préparation d'échantillon (SPE) en ligne [19,22],
- un gradient d'élution [19,15].

Au cours des travaux expérimentaux réalisés au laboratoire sur l'analyse d'urines, les métabolites du tamoxifène présents dans les urines ont pu être identifiés (Annexe IX) par chromatographie en phase liquide sur colonne de diamètre interne 4,6 mm couplée à la spectrométrie de masse en mode tandem.

b) Chromatographie en phase gazeuse

La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse est utilisée par les différents laboratoires de dépistage du dopage comme méthode de screening. Elle nécessite

d'être suffisamment sensible pour identifier l'ensemble des molécules dopantes présentes dans l'urine analysée.

Le tableau III.5 reporte les travaux publiés traitant de l'analyse des métabolites du tamoxifène par CPG-SM. Parmi les résultats présentés, il convient de relever que l'identification de certains métabolites (B et C) a été obtenue par impact électronique [8-9,11]. D'autre part, l'ionisation chimique en mode négatif a été appliquée au dosage du 4-hydroxytamoxifène (métabolite B) dans des matrices complexes telles que le plasma ou les tissus mammaires, une LOQ de l'ordre de la femtomole a alors été atteinte [24]. Une étude quantitative a aussi été menée en mode SIM de l'impact électronique, cette dernière a permis d'atteindre une LOQ de 0,02 µg/mL dans une matrice urinaire [8].

Molécules (Annexe IX)	Matrice	Préparation d'échantillon	Conditions chromatographiques	Détection - Source - Analyseur (marque fournisseur)	- Identification - Quantification	Réf.
tamoxifène 4 métabolites : 4-hydroxytamoxifène (B) N-démethyltamoxifène (X) N-dédimethyltamoxifène (Z) N-oxyde-tamoxifène	sérum humain	Extraction SPE en ligne HLB (Waters,Milford,MA,USA) 50 mm x 1 mm	- colonne: Chromolith Performance RP-18e (Merck,Darmstadt,Germany) 100 mm x 4,6 mm - phase mobile : ACN / HCOOH 0,05 % _(aq) pH 2,8 (gradient) - D = 1 mL/min - durée : 5 min.	- TurboIon Spray - triple quadripôle (AB MDS Sciex, Concord, Canada)	SM/SM (MRM) - Identification des métabolites - Quantification et validation : LOQ : 0,25 ng/mL (B,X,Z) 1 ng/mL (N-oxyde-tamoxifène)	[19]
tamoxifène	plasma humain	Extraction SPE en ligne HLB (Waters,Milford,MA,USA) 50 mm x 1 mm	- colonne: Chromolith Performance RP-18e (Merck,Darmstadt,Germany) 100 mm x 4,6 mm - phase mobile : ACN 0,1% HCOOH / 0,1% HCOOH _(aq) (gradient) - D = 4 mL/min - durée ≤ 2 min.	- Z-spray ionization - triple quadripôle (Quattro Ultima,Micromass,Manchester,UK)	SM/SM (MRM) - Linéarité (2,5-5000 ng/mL) pondération en 1/x ²	[22]
tamoxifène 2 métabolites : 4-hydroxytamoxifène (B) N-dédimethyltamoxifène (Z)	standard	aucune	UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography) - colonne: Acquity reverse phase column C ₁₈ (Waters, Milford,MA,USA) 50 mm x 1 mm (1,7 µm) - phase mobile : ACN/0,1% HCOOH _(aq) - Vol.Inj. = 15 µL - D = 200 µL/min - durée : 3,5 min.	- Z-spray ionization - triple quadripôle (Quattro Ultima,Micromass,Manchester,UK)	SM/SM (MRM) Comparaison UPLC/HPLC: - sensibilité x 10 - vitesse x 5 - résolution identique	[21]

Tableau III.4 : Analyse du tamoxifène et de ses métabolites par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse.

<p>1 métabolite : 4-hydroxytamoxifène (B)</p>	<p>plasma souris</p>	<p>Précipitation des protéines par ACN</p>	<p>- colonne: Higgin Analytical Targa C₁₈ 10 cm x 300 µm (5 µm) - phase mobile : ACN/0,1% HCOOH_(aq) (gradient) - Vol.inj. = 1 µL - D = 3µL/min - durée : 10 min.</p>	<p>- TurboIon Spray - triple quadripôle (AB MDS Sciex, Concord, Canada)</p>	<p>SM/SM (MRM) - Identification - Quantification et linéarité : LOQ : 100 pg/mL (25 µL plasma) - Linéarité (100 pg/mL – 100 ng/mL) pondération en 1/x²</p>	<p>[15]</p>
<p>tamoxifène 2 métabolites : 4-hydroxytamoxifène (B)</p>	<p>microsomes du foie</p>	<p>Broyage et extraction par solvants organiques</p>	<p>- colonne: Hypersil BDS C₁₈ (Hypersil,Runcorn,Cheshire,UK) 250 mmx 4,6 mm (5 µm) - phase mobile: MeOH/AcONH₄ 0,5 M - D = 1 mL/min - durée: 25 min.</p>	<p>- ESI - triple quadripôle (VG organic, Manchester,UK)</p>	<p>SM/SM - Identification (full scan à partir de l'ion parent) Etude de métabolites potentiellement génotoxiques.</p>	<p>[20]</p>
<p>tamoxifène 3 métabolites : 4-hydroxytamoxifène (B) di-hydroxytamoxifène (D) N-démethyl-4- hydroxytamoxifène (BX)</p>	<p>urine</p>	<p>LLE urine (10 mL) / hexane-butanol 98-2% (5 mL)</p>	<p>- colonne: Keystone EDS Hypersil C₁₈ (Hypersil,Runcorn,Cheshire,UK) 50 mm x 1 mm (3 µm) - Vol.inj. = 3 µL - phase mobile: ACN HCOOH 0,1% / HCOOH 0,1%_(aq) (gradient) - D = 60 µL/min - durée: 40 min.</p>	<p>- ESI -triple quadripôle (AB MDS Sciex, Concord, Canada)</p>	<p>SM/SM - Identification (full scan à partir de l'ion parent)</p>	<p>[23]</p>

Tableau III.4 : Analyse du tamoxifène et de ses métabolites par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse.

Molécules (Annexe IX)	Matrice	Préparation d'échantillon	Conditions chromatographiques	Détection - Source - Analyseur	- Identification - Quantification	Réf.
métabolite : 4-hydroxytamoxifène (B)	- plasma - tissus	- cartouche SPE Extrelut 1 - alkylation de la fonction phénol avec le chlorure de pentafluorobenzène	- colonne: CP Sil 5 (100% méthylsilicone) (Chrompack, Middelburg, Netherlands) 12,5 m x 0,32 mm I.D. x 0,33 µm	HP 5900 GC-SM (Agilent) - Ionisation chimique en mode négatif, méthane. - $E_{\text{électron}} = 80 \text{ eV}$ - $T_{\text{ion.source}} = 200^\circ\text{C}$ - Quadripôle	SM - Quantification ≈ 1 femtomole ≈ 40 pg	[24]
métabolites : 4-hydroxytamoxifène (B) N-démethyltamoxifène (X)	urine	- cartouche SPE XAD-2 (Rohm & Haas, Amberlite) - ajout étalon interne (citrate de tamoxifène) - hydrolyse enzymatique - LLE (diéthyle éther) - silylation de la fonction phénol de (B) par MSTFA et acétylation de la fonction amine secondaire de (X) par MBTFA.	- colonne : HP 5-MS (95% methyl, 5 % phenylpolysiloxane, Agilent) 17 m x 0,25 mm I.D x 0,12 µm - gaz vecteur : Helium D = 1 mL/min - T : 180°C – 310°C (10°C/min) - Split : 1/10	HP 6890 GC-SM (Agilent) - Impact électronique - $E_{\text{électron}} = 70 \text{ eV}$ - $T_{\text{ion source}} = 200^\circ\text{C}$ - Quadripôle	SM - Identification de 2 métabolites - Quantification de (B), point bas de la droite d'étalonnage = 0,02 µg/mL. Mode SIM : m/z = 72 ((CH ₃) ₂ N-CH ₂ CH ₂) 58 ((CH ₃) ₂ N-CH ₂) 459 (B-TMS) 371 (tamoxifène, étalon interne)	[8]

Tableau III.5 : Analyse du tamoxifène et de ses métabolites par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

<p>métabolites : acide carboxylique du tamoxifène (n°4) hydroxy-methoxytamoxifène (C)</p>	<p>urine</p>	<ul style="list-style-type: none"> - cartouche SPE XAD-2 (Rohm & Haas, Amberlite) - ajout étalon interne (tamoxifène) - hydrolyse enzymatique - LLE diéthyle éther (phase aqueuse pH 9) - silylation par MSTFA et acétylation par MBTFA. 	<ul style="list-style-type: none"> - colonne : HP-1 (100% méthylsilicone) (Agilent) 17 m x 0,21 mm I.D.x 0,33 µm - gaz vecteur: Hélium D = 0,6 mL/min - T: 180°C – 310°C (10°C/min) - Vol._{inj.} = 2 µL - Splitless 	<p>HP GC/MS (HP 5890/HP 5989) (Agilent)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Impact électronique - E_{electron} = 70 eV - Ionisation chimique en mode positif, méthane - Quadripôle 	<p>SM</p> <ul style="list-style-type: none"> - Identification de 2 métabolites 	<p>[11]</p>
<p>métabolite : Hydroxy-methoxytamoxifène (C)</p>	<p>urine</p>	<ul style="list-style-type: none"> - LLE pentane - silylation par MSTFA/NH₄I/ethanethiol 1000/2 /3 (v/w/v) 	<ul style="list-style-type: none"> - colonne: HP Ultra I (OV-1, 100% méthylsiloxane) 17 m x 0,2 mm I.D.x 0,11 µm - gaz vecteur: Hélium - T: 180°C – 229°C (3°C/min) – 320°C (40°C/min) - Vol._{inj.} = 3 µL - Split : 1/10 	<p>HP GC/MS (HP 6890/HP 5973) (Agilent)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Impact électronique - E_{electron} = 70 eV - Quadripôle 	<p>SM</p> <ul style="list-style-type: none"> - Identification des métabolites - Suivi de l'excrétion des stéroïdes endogènes sur 6 semaines suite à la prise de tamoxifène (40 mg) 	<p>[9]</p>

Tableau III.5 : Analyse du tamoxifène et de ses métabolites par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

c) Electrophorèse capillaire

L'électrophorèse capillaire présente le double avantage de réduire le volume d'échantillon analysé (quelques nanolitres) ainsi que la quantité de phase mobile.

Le tableau III.6 apporte des données relatives à des travaux publiés. Plusieurs méthodes d'électrophorèse en milieu non aqueux ont été développées. L'ajout d'acide acétique ($\approx 1\%$) dans un mélange acétonitrile – méthanol transforme le tamoxifène en son acide conjugué, l'ion trialkylammonium chargé positivement. En tension positive, la mobilité électrophorétique et la mobilité électroosmotique de l'espèce cationique analysée sont de même signe induisant un temps d'analyse court (10 min) [25-27]. Le tamoxifène et son métabolite B ont été dosés dans des urines humaines révélant des limites de quantification de 33 ng/mL à 211 nm [26], soit un résultat équivalent à celui obtenu par CPG-SM en mode SIM [8]. D'autre part, le tamoxifène et deux de ses métabolites (B et D) ont été identifiés en couplant l'électrophorèse capillaire à la spectrométrie de masse en mode ESI [27].

Conclusion

Les travaux publiés à ce jour ont montré l'application possible des trois méthodes séparatives que sont la CPL, la CPG et l'EC pour l'analyse du tamoxifène et de ses métabolites.

En CPL et en EC, les groupements chromophores et la fonction amine ionisable du tamoxifène permettent d'utiliser des modes de détection tels que l'absorption UV et la spectrométrie de masse. Une dérivation post-colonne transforme le tamoxifène avant sa détection par fluorescence. Des protocoles ont été mis au point pour optimiser la sensibilité de chaque méthode d'analyse.

En CPG, le tamoxifène est rendu volatil par silylation et/ou acétylation. Les analyses par CPG ont toutes utilisé un couplage à la spectrométrie de masse afin d'identifier les métabolites du tamoxifène.

Au cours du travail de thèse présenté dans la suite du chapitre, les méthodes analytiques choisies ont été la CPL – UV (240 nm) et la CPL-SM tandem.

Molécules (Annexe IX)	Matrice	Préparation d'échantillon	Conditions chromatographiques	Détection	Commentaires	Réf.
tamoxifène produits de décomposition : isomères Z et E 4-hydroxytamoxifène (B) di-hydroxytamoxifène (D)	urine	dilution	NACE - ACN/MeOH (3/7, v/v) AcONH ₄ 20 mM - L = 55 cm x 50 µm - V = 20 kV - durée : 9 min.	- ESI - simple quadripôle (AB MDS Sciex, Concord, Canada)	- Identification (TIC)	[27]
tamoxifène métabolites : 4- hydroxytamoxifène (B) N-démethyltamoxifène (X)	sérum de rat	LLE sérum (1 mL) / hexane – alcool isoamylique 98-2% (5 mL)	NACE - ACN / MeOH (1/1, v/v) + AcONH ₄ 50 mM, AcOH (1%) - 57 cm x 50 µm - V = 15 kV - durée : 10 min.	214 nm	tamoxifène : LOQ = 10 pg	[25]
tamoxifène métabolite : 4- hydroxytamoxifène (B)	urine	SPE cartouche Sep-Pak Plus C ₁₈ (Waters, Milford, MA, USA) recouvrement > 96%	NACE - ACN/MeOH (20/80,v/v) AcONH ₄ 17 mM , AcOH 1,25% - 57 cm x 50 µm - V = 15 kV - durée : 8 min.	211 nm	Tamoxifène et son métabolite (B) : LOQ = 33 ng/mL	[26]

Tableau III.6 : Analyse du tamoxifène et de ses métabolites par électrophorèse capillaire.

III.1.3. Méthodes de préparation d'échantillons

Les analyses chromatographiques réalisées sur des matrices biologiques nécessitent une préparation d'échantillon visant à :

- ☞ éliminer, de façon la plus totale possible la matrice qui est à la source de coélutions en chromatographie, et de suppression ionique en spectrométrie de masse,
- ☞ préconcentrer les molécules recherchées afin d'obtenir une méthode sensible.

Dans le cas des urines, la matrice est essentiellement constituée de sels et de molécules très polaires telles que l'urée et la créatinine. De plus, la recherche des métabolites des anti-oestrogènes nécessite une hydrolyse enzymatique qui libère des hormones (éthiocholanolone et androstérone) de polarité proche de celle des principaux métabolites hydroxylés du tamoxifène (Annexe IX). Ces dernières, présentes en concentration élevée dans les urines mâles, risquent donc de coéluer avec les métabolites recherchés. Cette difficulté est contournée grâce à une préparation d'échantillon rigoureuse.

Les deux méthodes de préparation d'échantillon habituellement utilisées sont l'extraction liquide-liquide (Liquid-Liquid Extraction, LLE) et l'extraction solide-liquide (Solid-Phase Extraction, SPE).

a) Extraction liquide-liquide (LLE)

L'extraction liquide-liquide a été fréquemment utilisée comme méthode de préparation d'échantillons biologiques (plasma, urine) contenant des métabolites du tamoxifène. Cette méthode est à la fois économique et simple à mettre en œuvre.

Après hydrolyse enzymatique des métabolites glucuro-conjugués urinaires du tamoxifène, les molécules obtenues sont apolaires (les calculs réalisés avec le logiciel Pallas – CompuDrug (Budapest, Hongrie) donnent des valeurs de log P comprises entre 7 et 7,5 pour le tamoxifène et le 4-hydroxytamoxifène).

Un solvant apolaire tel que le pentane (ou l'hexane) a été utilisé pour l'extraction du 4-hydroxytamoxifène de l'urine avec un rendement de l'ordre de 40 % [9]. L'ajout d'un modificateur polaire tel que le butanol ou l'isopropanol (2–5% v/v), aussi capable d'interagir par liaisons hydrogène, améliore l'extraction avec un recouvrement de 84 % lors de la préparation d'un échantillon de plasma humain [17,23]. L'extraction par du diéthyl éther, solvant capable de créer des interactions dipôle-dipôle plus fortes que l'hexane ou le pentane, a été réalisée sur de l'urine [8] ou du sérum équin (recouvrement supérieur à 70 %) [18].

Le tableau III.7 indique les caractéristiques des principaux solvants utilisés en LLE selon Hildebrand et Rohrschneider. Dans chaque cas, le paramètre est donné soit de façon globale ou de façon détaillée afin de mieux évaluer les interactions dipôle-dipôle et les liaisons hydrogène déployées entre les molécules de solvant et le 4-hydroxytamoxifène.

Solvant	δ (cal ^{1/2} cm ^{-3/2})	P'	δ_n (cal ^{1/2} cm ^{-3/2})	P _n	δ_h (cal ^{1/2} cm ^{-3/2})
hexane	7,3	0,1	0,0	/	0,0
pentane	7,0	/	0,0	/	0,0
diéthyl éther	7,4	2,8	1,4	1,4	2,5
butanol	11,4	3,9	2,8	2,8	7,7
isopropanol	11,5	3,9	3,0	3,0	8,0
eau	23,4	10,2	7,8	2,6	20,7

Tableau III.7 : Paramètres de solubilité des solvants selon Hildebrand et de polarité selon Rohrschneider [Annexe I].

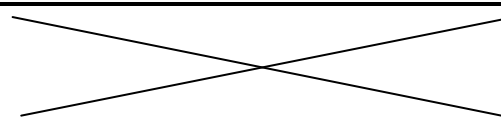
δ : paramètre de solubilité selon Hildebrand ; P' : polarité des solvants selon Rohrschneider ; interactions dipôle-dipôle (δ_n , P_n) ; liaisons hydrogène (δ_h).

Le tamoxifène (pK_A ≈ 8,8) est majoritairement sous forme ionique au pH de l'urine après ajout d'une solution tampon phosphate (pH 6) favorable à l'hydrolyse enzymatique. Or, le caractère ionique du tamoxifène diminue son rendement d'extraction par les solvants peu polaires usuellement utilisés en LLE.

b) Extraction solide-liquide (SPE)

A l'heure actuelle, l'analyse des métabolites du tamoxifène retrouvés dans les urines d'athlètes dopés [1,11] et de femmes sous traitement préventif du cancer du sein [26] met en place une étape initiale de SPE sur phase stationnaire apolaire (C₁₈ : Waters Sep-Pak Plus, Varian Bond Elut C₁₈ ou styrène-divinylbenzène : Rohm & Haas Amberlite XAD-2) avant l'étape d'hydrolyse enzymatique. Dans chaque procédure, l'urine portée à pH 7 est déposée directement sur la cartouche SPE. Les étapes de lavage diffèrent selon les protocoles :

1) SPE	A (dopage [1,11])	B (traitement préventif du cancer du sein [26])
Dépôt	urine diluée dans un tampon phosphate pH 7	urine diluée dans un tampon phosphate pH 7
Lavage(s)	H ₂ O	1) tampon phosphate pH 7, 10 mM 2) CH ₃ OH / H ₂ O 50-50 (v/v) 3) CH ₃ OH (V < 1 mL)
Elution	CH ₃ OH	CH ₃ OH

2) LLE (après hydrolyse enzymatique)	échantillon (pH 9) / hexane ou diéthyl éther	
--	---	--

Dans le protocole A, le lavage à l'eau a un pouvoir éluant insuffisant vis-à-vis d'un certain nombre de molécules présentes dans la matrice urinaire, et des molécules endogènes moyennement polaires se retrouvent totalement dans la phase d'éluion. Une étape supplémentaire d'extraction liquide-liquide (hexane ou diéthyl éther) extrait alors les anti-oestrogènes et les molécules d'hydrophobie équivalente.

Le protocole B permet de préconcentrer l'échantillon en 4-hydroxytamoxifène d'un facteur 5 avec un rendement proche de 100 %. La fraction d'éluion est analysée par électrophorèse capillaire. L'électrophérogramme obtenu présente une ligne de base exempte de pics interférents à des temps de migration proches de celui du 4-hydroxytamoxifène [26].

Les deux protocoles permettent l'élimination des espèces ioniques et/ou polaires de l'urine, mais aucun n'est suffisamment spécifique pour éliminer les molécules endogènes de polarité proche de celle du tamoxifène.

Récemment, des polymères à empreintes moléculaires du tamoxifène ont été préparés afin de tester leur spécificité [28-30].

Une étude menée par B.A.Rachid [28] a permis d'évaluer un polymère à empreintes moléculaires du tamoxifène. Plusieurs lavages organiques ont été testés révélant la sélectivité du matériau par comparaison des recouvrements obtenus sur le MIP et sur le NIP. Les applications sur du plasma et de l'urine non hydrolysée ont montré un faible pic de la matrice polaire sans qu'aucun rendement d'extraction n'ait été mentionné. D'autre part, le relargage

important du tamoxifène lors de l'étape d'élution interdit tout dosage du tamoxifène à de faibles concentrations.

Dans une seconde étude, P.D.Martin [30] a préparé un MIP à partir du tamoxifène et a montré la faible affinité du MIP vis-à-vis de sa molécule empreinte. Paradoxalement, un MIP préparé à partir du propranolol offre une affinité suffisante vis-à-vis du tamoxifène pour envisager une extraction spécifique de cette molécule contenue dans une matrice complexe. Les auteurs devaient tenter d'expliquer ce résultat par modélisation moléculaire, à ce jour, aucune nouvelle étude n'a été publiée.

Ces premiers résultats publiés ont semblé suffisamment encourageants pour étudier de façon approfondie la synthèse et les caractéristiques d'un MIP du tamoxifène et pour l'appliquer à l'urine hydrolysée d'un sportif dopé. Afin d'éviter les problèmes d'interférence dus au relargage de la molécule empreinte, nous avons réalisé la synthèse du MIP avec un analogue chloré du tamoxifène, le clomiphène.

III.2) ETUDE DU SUPPORT A RECONNAISSANCE MOLECULAIRE DU TAMOXIFENE

III.2.1. Synthèse

La préparation du MIP a été réalisée de façon non covalente en mélangeant la molécule empreinte (clomiphène), le monomère fonctionnel (acide méthacrylique, MAA), l'agent réticulant (éthylène glycol diméthacrylate, EDMA) et le solvant porogène (acétonitrile). Le protocole expérimental est détaillé dans l'annexe IV.

Au sein du polymère, l'empreinte se forme autour du clomiphène à partir de liaisons fortes telles que les liaisons hydrogène existant entre l'acide méthacrylique et les trois groupes polaires de la molécule empreinte (amine tertiaire, éther-oxyde, atome de chlore). Compte tenu du caractère basique du clomiphène, la fonction amine tertiaire est partiellement ionisée et des interactions ioniques apparaissent entre l'amine ($pK_A = 8,8$) et l'acide méthacrylique ($pK_A \approx 5$). Les parties non fonctionnalisées du clomiphène interagissent avec le co-polymère EDMA-MAA par des liaisons de Van der Waals et des liaisons π - π , ces dernières étant particulièrement intenses au niveau des noyaux aromatiques du clomiphène (**Figure III.1**).

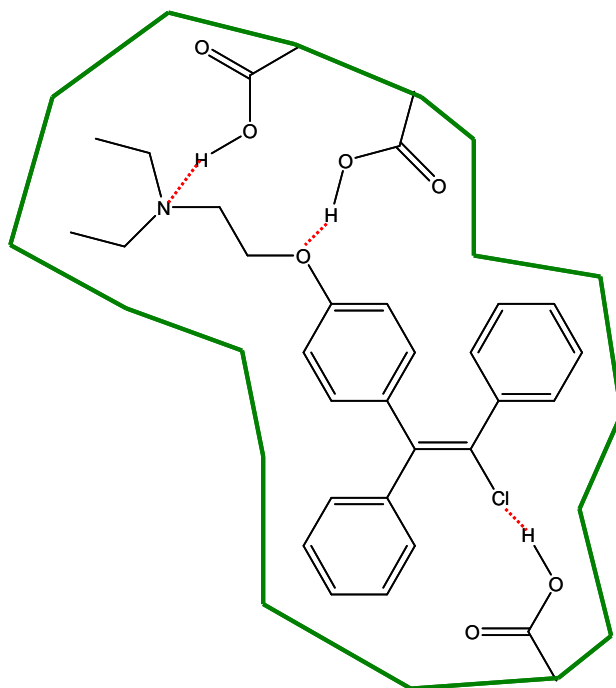


Figure III.1: Schéma d'une empreinte formée autour du clomiphène ;

..... liaison hydrogène (ou interaction ionique pour la fonction amine tertiaire du clomiphène).

La stoechiométrie du mélange de prépolymérisation répond aux proportions suivantes : clomiphène/MAA/EDMA : 1/8/40 en équivalents molaires. L'excès de monomère fonctionnel doit favoriser la stabilité du complexe de prépolymérisation formé entre le clomiphène et l'acide méthacrylique.

On notera MIP A le polymère imprimé avec MAA comme monomère fonctionnel et MIP B celui synthétisé en remplaçant 50 % du MAA par du styrène (Annexe IV).

Les MIP et NIP obtenus sont caractérisés grâce à leurs isothermes d'adsorption qui mettent en évidence la formation d'empreintes au sein du MIP. Les caractéristiques morphologiques (surface spécifique, porosité) du polymère ont aussi été étudiées.

III.2.2. Mise en évidence des empreintes

Le tracé d'isothermes d'adsorption implique de mesurer la quantité de soluté capturé par une masse donnée de polymère. Le soluté choisi est la molécule empreinte ou une molécule de structure très voisine. Le polymère est introduit dans un flacon fermé contenant une solution de concentration connue en soluté. Une agitation de quelques heures à température ambiante est suffisante pour atteindre l'état d'équilibre du système, une partie du soluté est alors adsorbée par le polymère. Dans le cas présent, on choisit de suivre l'adsorption du tamoxifène puisque cette molécule et ses métabolites constituent les composés recherchés, par la suite, dans l'urine. Les solutions de tamoxifène sont préparées dans le solvant porogène (ACN).

a) Conditions expérimentales

Des vials ambrés (volume 1,5 mL) sont remplis d'une masse connue de polymère (MIP ou NIP). Un volume (1 mL) de tamoxifène dans ACN est introduit dans chaque vial. Les vials sont agités pendant 3 heures, à température ambiante. Lorsque l'équilibre est atteint (3 h), le contenu de chaque vial est filtré sur un filtre-seringue (1 mL, porosité 0,2 µm, diamètre 13 mm, GHP Acrodisc, Gelman). Le filtrat est évaporé à sec sous flux d'azote. Le résidu sec est dissous dans 1 mL de phase mobile puis analysé en CPL. On obtient ainsi la concentration en soluté non adsorbé, notée F. Les conditions chromatographiques d'analyse du tamoxifène sont décrites dans l'annexe XI.

b) Isothermes d'adsorption (concentration en tamoxifène constante et masse de polymère variable)

La concentration initiale (notée T) en tamoxifène est fixée à 2 µg/mL et les masses de MIP A (ou NIP A) introduites dans chaque vial sont égales respectivement à 1, 3, 5, 8 et 10 mg. Les résultats sont représentés par un ensemble de points expérimentaux dont l'ordonnée correspond à la fraction de tamoxifène adsorbé par le polymère (B/T (%)), et l'abscisse à la concentration massique (mg/mL) de polymère en suspension dans la solution (**Figure III.2**).

Dans 1 mL de solution, T représente la quantité initiale de tamoxifène, F celle de tamoxifène non adsorbée à l'équilibre et B, quantité de tamoxifène adsorbée, est calculée à partir de l'équation [III.3].

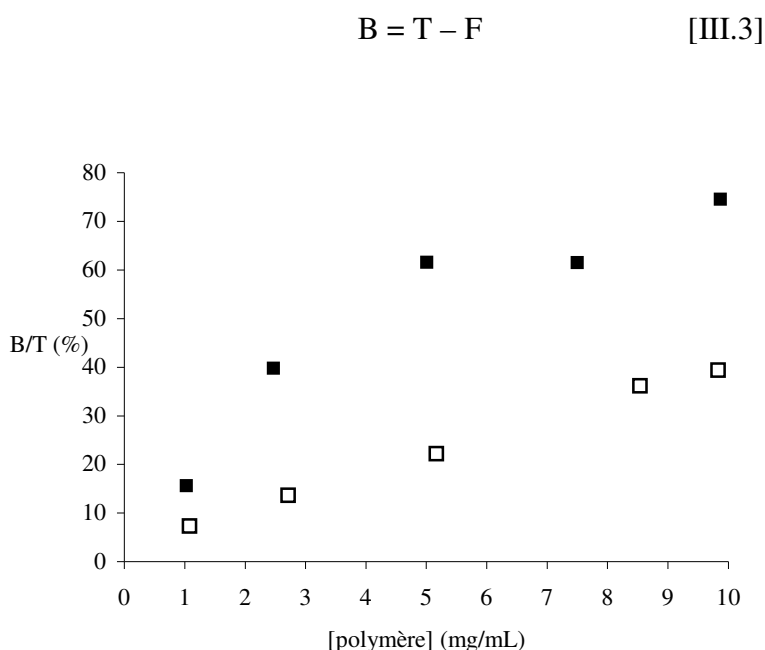


Figure III.2: Profils d'adsorption du tamoxifène sur le MIP A (■) et sur le NIP A (□).

Concentration en tamoxifène : 2 µg/mL dans ACN ; température : 25 °C ; volume solution : 1 mL ; temps d'adsorption : 3 heures.

Lorsqu'une masse de 5 mg de polymère est introduite dans 1 mL de solution, on constate que le tamoxifène (2 µg/mL) est adsorbé à 61 % sur le MIP et à 22 % sur le NIP. Le MIP retient trois fois plus le tamoxifène que le NIP par des interactions spécifiques et non spécifiques. A l'opposé, la rétention du tamoxifène sur le NIP n'est due qu'à des interactions non spécifiques.

Le tamoxifène satisfait à la majorité des critères de reconnaissance de forme imposés par les empreintes du clomiphène (**Figure III.3**). En effet, les différences existant entre le tamoxifène et le clomiphène sont de nature stérique (le volume de la molécule de clomiphène (425 Å³))

étant légèrement supérieur à celui de la molécule de tamoxifène (410 \AA^3), voir annexe XII) et de nature fonctionnelle (absence de l'atome de chlore dans le tamoxifène entraînant la disparition d'une liaison hydrogène).

De plus, la reconnaissance de forme est favorisée dans le solvant porogène (ACN) qui redonne sa morphologie initiale au polymère et aux empreintes [31].

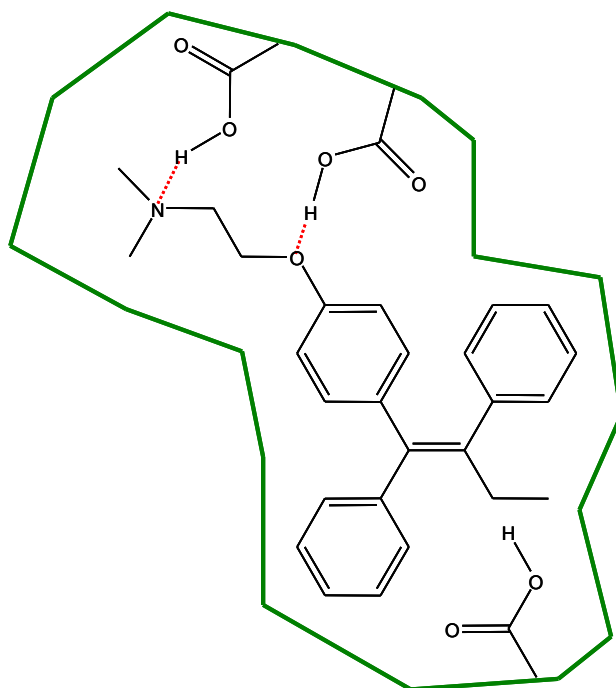


Figure III.3: Schéma d'une empreinte contenant une molécule de tamoxifène

..... liaison hydrogène (ou ionique pour la fonction amine tertiaire du tamoxifène).

c) Isothermes de Freundlich et distribution d'affinité (concentration en tamoxifène variable et masse de polymère constante)

Il est admis qu'un MIP synthétisé dans des conditions non covalentes présente des sites hétérogènes en forme et en énergie. L'hétérogénéité des sites d'adsorption limite la capacité et surtout la spécificité du MIP vis-à-vis de la molécule empreinte et de ses analogues.

Le modèle de distribution continue de Freundlich est choisi afin de caractériser l'hétérogénéité des MIPs et d'estimer le nombre apparent de sites en fonction de l'affinité de ces derniers pour la molécule ciblée.

c-1) Constante d'association K_{ass}

Une masse donnée de polymère (MIP ou NIP), contenant des sites d'adsorption (S_{MIP} ou S_{NIP}), est mise en suspension dans des solutions de concentrations croissantes en soluté A (molécule empreinte ou analogues). Après un temps d'agitation, l'équilibre d'adsorption formant un complexe $[A-S_{\text{MIP}}]$ est atteint, et est exprimé comme ci-dessous.



$$K_{\text{ass}} = \frac{a_{[A-S_{\text{MIP}}]}}{a_{S_{\text{MIP}}} \cdot a_A} \quad \text{[III.5]}$$

$a_{[A-S_{\text{MIP}}]}$, $a_{S_{\text{MIP}}}$, a_A sont les activités des espèces actives à l'équilibre.

Or, S_{MIP} et $[A-S_{\text{MIP}}]$ sont des corps en phase condensée, assimilés à des corps purs. On pose:

$$a_{[A-S_{\text{MIP}}]} = 1 \text{ et } a_{S_{\text{MIP}}} = 1.$$

Soit F, la concentration en soluté A resté en solution à l'équilibre. La solution est diluée ($\gamma_A = 1$) donc $a_A = F$ (mol/L).

L'expression de K_{ass} est simplifiée et ne dépend que de F :

$$K_{\text{ass}} = 1/F \quad (\text{L/mol}) \quad \text{[III.6]}$$

A l'équilibre, la constante d'association K_{ass} révèle l'affinité du polymère vis-à-vis du soluté A.

c-2) Isotherme de Freundlich

L'isotherme de Freundlich pose la relation suivante entre la quantité de soluté adsorbée par unité de masse de polymère (S_b , $\mu\text{mol/g}$) et la concentration en soluté non adsorbé (F, mol/L) :

$$S_b = a.F^m \quad \text{[III.7]}$$

L'isotherme de Freundlich peut aussi s'exprimer sous la forme log-log :

$$\log S_b = \log a + m \log F \quad \text{[III.8]}$$

a et m sont les paramètres de Freundlich, avec m, indice d'hétérogénéité, compris entre 0 et 1. Le paramètre m évalue l'hétérogénéité des sites d'adsorption du MIP et du NIP. Lorsque la valeur de m se rapproche de 0, l'hétérogénéité du matériau tend à augmenter. Un système homogène a une valeur de m égale à 1.

Ainsi, la différence d'hétérogénéité entre des polymères peut facilement être reconnue par comparaison des pentes des isothermes tracées en mode log-log.

a est corrélé au nombre total de sites d'adsorption (N_t), à la constante d'association moyenne (K_o) et à l'indice d'hétérogénéité m.

La limite de l'équation de Freundlich porte sur l'impossibilité mathématique de déterminer, non seulement le nombre de sites d'adsorption total (N_t) du polymère, mais aussi sa constante d'association moyenne (K_o), ces deux inconnues étant réunies sous la forme d'un produit dans le seul terme a [50].

c-3) Distribution d'affinité

La distribution d'affinité tirée d'une isotherme de Freundlich montre une décroissance de forme exponentielle du nombre apparent de sites d'adsorption N en fonction de la constante d'association K_{ass} comprise dans un intervalle [K_{min} – K_{max}]. Cet intervalle est lié aux concentrations en soluté choisies pour le tracé des isothermes d'adsorption, $K_{min} = 1/F_{max}$ et $K_{max} = 1/F_{min}$. Une première expression simplifiée a été établie par R.Sips [32,33] puis appliquée aux MIPs par l'équipe de G.Guiochon [34]. Simultanément, l'équipe de K.D.Shimizu développait une expression similaire à celle de G.Guiochon [35]:

$$N(K_{ass}) = 2,303.a.m.(1 - m^2).K_{ass}^{-m} \quad \text{[III.9]}$$

Selon l'équation [III.9], N décroît de façon exponentielle avec $\text{Ln}K_{ass}$ (**Figure III.4**).

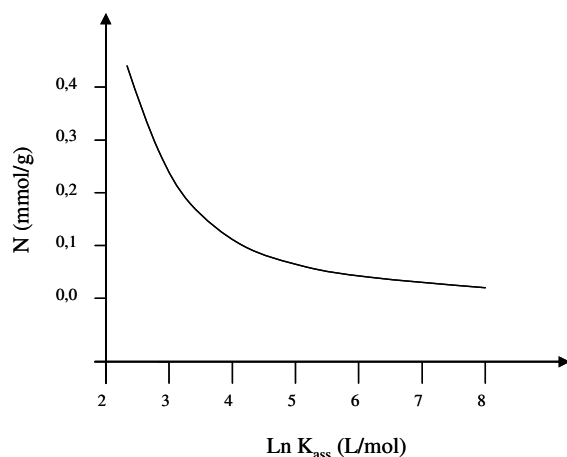


Figure III.4 : Distribution d'affinité des sites d'adsorption dans le modèle de Freundlich.

Cette fonction, toujours positive, tend vers 0 pour les valeurs élevées de K_{ass} et tend vers l'infini pour de faibles valeurs de K_{ass} . Cette croissance à l'infini du nombre de sites d'adsorption pour les faibles valeurs de constante d'association constitue une limite du modèle de Freundlich [36]. Ce modèle ne peut donc être appliqué qu'à des valeurs de K_{ass} suffisamment élevées, pour des concentrations en soluté faibles. Ces conditions expérimentales sont souvent éloignées de la saturation du polymère étudié. On travaille dans le domaine de subsaturation, facilement identifiable par la linéarité de la forme log-log de l'isotherme de Freundlich illustrée dans la figure III.5.

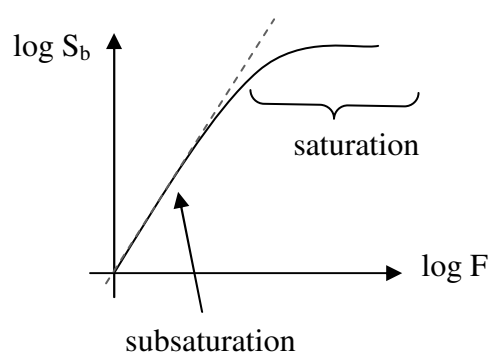


Figure III.5 : Illustration des domaines de subsaturation et de saturation de l'isotherme de Freundlich.

Pour un domaine fini $[\text{Ln}K_1 - \text{Ln}K_2]$, la surface située en dessous de la courbe de distribution d'affinité (**Figure III.4**) est liée au nombre apparent de sites d'adsorption. Une approche similaire consiste à tracer la fonction $\text{Ln } N = f(\text{Ln}K_{\text{ass}})$ dont l'expression tirée de l'équation [III.9] est :

$$\ln N = \ln (2,303.a.m.(1 - m^2)) - m.LnK_{ass} \quad [III.10]$$

Le segment de droite ainsi obtenu a sa position verticale liée au nombre apparent de sites d'adsorption. La pente du segment dépend de l'hétérogénéité du polymère (m).

La comparaison d'un MIP au NIP, ou de deux MIPs entre eux, est alors possible à partir de leurs distributions d'affinité et à condition de travailler dans la même gamme de valeurs de K_{ass} , soit le même domaine $[F_{min} - F_{max}]$.

Afin d'évaluer le nombre de sites d'adsorption (N), une nouvelle fonction permet de calculer la surface comprise sous la courbe d'affinité $N = f(\ln K_{ass})$ dans l'intervalle $[K_1 ; K_2]$ [III.11].

$$N_{K_1-K_2} = 2,303.a.(1-m^2).(K_1^{-m} - K_2^{-m}) \quad [III.11]$$

c-4) Application des isothermes de Freundlich au MIP du tamoxifène

α) Conditions expérimentales :

Le tracé des isothermes de Freundlich a été réalisé sur deux MIPs dont les principales caractéristiques de synthèse sont résumées dans le tableau III.8.

Polymère	Molécule empreinte	Monomère(s) fonctionnel(s)	Agent réticulant	Solvant porogène
MIP A	Citrate de clomiphène	MAA	EDMA	ACN
MIP B	Clomiphène	MAA-styrène	EDMA	ACN

Tableau III.8 : Nature des réactifs de synthèse des MIPs A et B.

10 échantillons ont été préparés dans des vials ambrés (volume 1,5 mL), chacun d'eux contenant 10 mg de polymère (MIP ou NIP) et 1 mL de tamoxifène dans ACN à des concentrations comprises entre 0,013 et 2,7 mM. On estime l'équilibre d'adsorption atteint au terme de 3 heures d'agitation.

β) Tracé des isothermes de Freundlich :

Les valeurs expérimentales obtenues au cours des équilibres d'adsorption du tamoxifène sur les polymères (MIP A, NIP A, MIP B et NIP B) ont permis de tracer les isothermes de Freundlich selon la relation [III.8] (**Figure III.6**). Les coefficients de corrélation r^2 des

régressions linéaires, toujours supérieures à 0,98, prouvent la validité du modèle de Freundlich et confirment le choix de la gamme de concentration située dans le domaine de subsaturation. Le tableau III.9 regroupe les valeurs de r^2 , m et a obtenues pour les différents polymères.

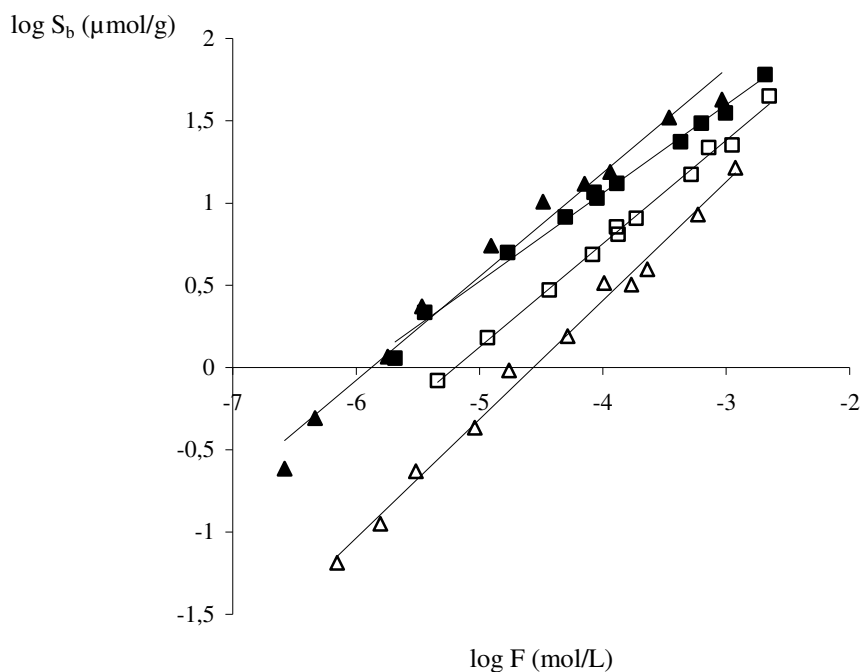


Figure III.6 : Isothermes de Freundlich tracées pour MIP A (■), NIP A (□), MIP B (▲) et NIP B (△).

Polymère	r^2	m	a
MIP A	0,9924	0,537	1617
NIP A	0,9959	0,628	1846
MIP B	0,9849	0,665	7881
NIP B	0,9922	0,722	1980

Tableau III.9 : Paramètres expérimentaux (r^2 , m , a) des isothermes de Freundlich.

Les valeurs de m obtenues pour les NIPs sont systématiquement supérieures à celles du MIP correspondant, ce qui est en accord avec des résultats publiés portant sur la comparaison de polymères imprimés [37]. On en déduit que le MIP est plus hétérogène que le NIP, probablement à cause de la formation d'empreintes au sein du MIP.

Cependant, la valeur de m obtenue pour chaque NIP est suffisamment éloignée de l'unité pour ne pas négliger l'hétérogénéité des sites d'adsorption présents dans ce polymère. Au sein de

cette diversité, on peut supposer que certains sites d'adsorption du NIP ont une affinité vis-à-vis du tamoxifène équivalente à celle de sites retrouvés dans le MIP.

γ) Distribution d'affinité :

Le tracé de $\ln N$ en fonction de $\ln K_{\text{ass}}$ est réalisé à partir de l'équation [III.11] pour le calcul de N et de la relation [III.6] pour celui de K_{ass} en choisissant des valeurs de F obtenues au cours du tracé des isothermes de Freundlich. Les calculs ont été effectués dans une gamme de concentration éloignée de la saturation, soient des valeurs de F comprises entre $1,5 \cdot 10^{-6}$ et $5 \cdot 10^{-5}$ mol/L (**Figure III.7**).

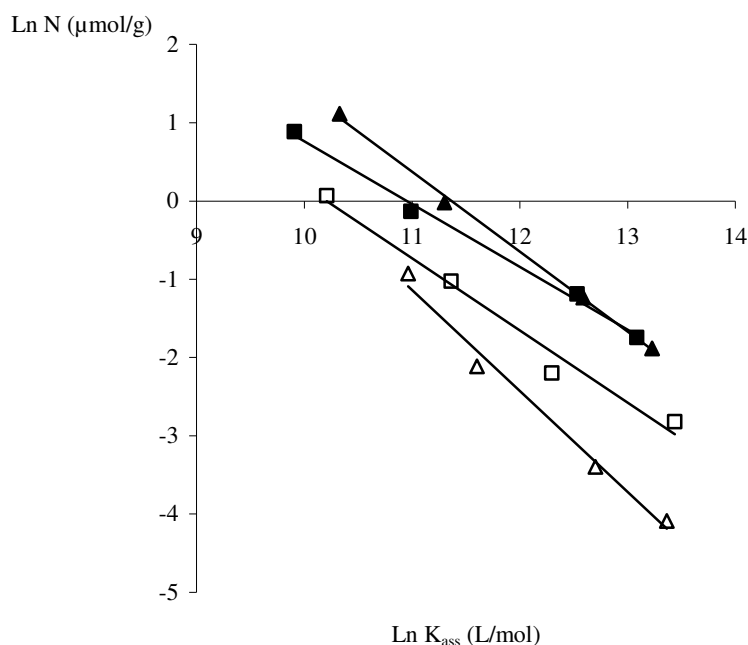


Figure III.7 : Distributions d'affinité déterminées à partir des isothermes de Freundlich pour MIP A (■), NIP A (□), MIP B (▲) et NIP B (△). Gamme de concentration en tamoxifène comprise entre $1,5 \cdot 10^{-6}$ et $5 \cdot 10^{-5}$ mol/L.

Pour chaque polymère A et B, la droite de distribution d'affinité du MIP est toujours située au-dessus de celle du NIP. Ceci implique un nombre apparent de sites d'adsorption du MIP supérieur à celui du NIP, soit une capacité plus élevée du MIP par rapport au NIP dans la gamme de concentration sélectionnée. En outre, cette différence est plus significative pour les polymères B. Une des principales distinctions entre les protocoles de synthèse A et B réside dans la nature des monomères fonctionnels ; 100 % MAA utilisé dans le protocole A 50 % MAA – 50 % styrène dans le protocole B. Les interactions non spécifiques de types liaisons

hydrogène ou interactions ioniques, issues des résidus monomériques MAA situés en surface de polymère, sont moins nombreuses dans le polymère B que dans le polymère A.

La pente d'une droite de distribution d'affinité est liée au rapport $R = (\text{nombre de sites de forte affinité} / \text{nombre de sites de faible affinité})$ [37]. Une droite tend à être horizontale lorsque la proportion relative de sites de forte affinité augmente. Or, les sites de forte affinité sont assimilés aux empreintes les mieux formées, capables de reconnaître spécifiquement les molécules d'intérêt (molécule empreinte ou analogue) au sein d'une matrice. Au regard des pentes de distribution d'affinité de chaque polymère A et B, le MIP présente systématiquement une valeur de R supérieure à celle obtenue pour le NIP, indiquant ainsi la plus grande spécificité du MIP par rapport au NIP.

d) Conclusion

Les équilibres d'adsorption réalisés pour les polymères A et B ont montré la différence de capacité d'adsorption du MIP et du NIP vis-à-vis du tamoxifène dans l'acétonitrile, et prouvé la formation de sites d'affinité élevée pour le tamoxifène dans le MIP. Ces sites, encore appelés empreintes, ont des formes différentes et des énergies d'adsorption variables. Cette hétérogénéité des matériaux obtenus par voie non covalente a été montrée par le tracé des isothermes de Freundlich et celui des courbes de distribution d'affinité. Ces mêmes résultats ont prouvé que l'adsorption du tamoxifène par le NIP, due à des interactions non spécifiques, dépendait de la nature du polymère. Ces remarques seront approfondies lors de l'application des MIPs A et B à l'extraction solide-liquide du tamoxifène dans la matrice urinaire.

III.2.3. Morphologie

Les polymères à empreintes moléculaires sont des solides amorphes. Des informations telles que la surface spécifique et la porosité ou encore la forme et la taille des particules peuvent être obtenues par isothermes d'adsorption d'azote avec une analyse BET (Brunauer, Emmett et Teller) ou par microscopie électronique à balayage (MEB).

Ces données présentent un intérêt pour la comparaison de plusieurs MIPs entre eux. Ces polymères peuvent avoir été synthétisés par des équipes différentes. Un autre cas de figure concerne l'optimisation de la synthèse d'un MIP. Cette démarche inclut des changements de paramètres tels que les quantités de monomères fonctionnels, d'agent réticulant voire de solvant porogène et la température de synthèse [38].

a) Détermination de la surface spécifique et du volume poreux

D.A.Spivak rappelle la présence des micropores (< 2 nm), des mésopores (2-50 nm) et macropores (50-1000 nm) dans les MIPs [39]. La diffusion des molécules vers les empreintes est liée à la porosité du polymère. L'accès aux empreintes est favorisé lorsque ces dernières se situent dans les macro- ou mésopores. Les tailles des macro- et mésopores sont généralement déterminées par intrusion de mercure dans le matériau poreux. Ne disposant pas de cette technique porosimétrique, nous n'avons pas eu accès à la répartition en taille des méso- et macropores dans les polymères synthétisés.

En revanche, la surface spécifique et le volume poreux spécifique total des polymères A et B ont été évalués par des isothermes d'adsorption d'azote auxquelles le modèle mathématique BET a été appliqué (expériences réalisées par l'équipe du Professeur Béguin au CRMD, Orléans).

Le tableau III.10 reporte les valeurs de surface spécifique et de volume poreux obtenues pour le MIP A (préparé à partir de MAA et du citrate de clomiphène) et le MIP B (préparé à partir de styrène-MAA et de clomiphène).

Echantillon	Surface spécifique (m ² /g)	$\Delta S_{\text{spéc. MIP-NIP}}$ (m ² /g)	Volume poreux spécifique total (cm ³ /g)
MIP A	372	5	0,72
NIP A	367		0,70

MIP B	348	50	0,71
NIP B	298		0,60

Tableau III.10: Surfaces spécifiques et volumes poreux obtenus par analyse BET du MIP A, NIP A, MIP B et NIP B.

Dans la littérature [40], un MIP synthétisé à partir de la L-phénylalanine anilide (L-PheNHPh) dans l'acétonitrile a une surface spécifique de $317 \text{ m}^2/\text{g}$ et un volume poreux de $0,89 \text{ cm}^3/\text{g}$. Ces valeurs sont fonction principalement des proportions en agent réticulant et en solvant porogène utilisées lors de la synthèse du MIP [41]. Nous avons utilisé le même solvant porogène (ACN) avec des réactifs en proportions équivalentes pour la synthèse des MIPs A et B. Ainsi, on retrouve des valeurs de surface spécifique et de volume poreux pour les MIPs A et B équivalentes à celles obtenues pour le MIP- L-PheNHPh.

De plus, on remarque que le MIP (A et B) a systématiquement une surface spécifique et un volume poreux supérieurs à ceux du NIP (A et B).

b) Détermination de la taille des particules et de leur morphologie par MEB

L'étude du MIP A et du NIP A par microscopie électronique à balayage a permis d'apprécier les différences de morphologie du matériau (**Figure III.8**).

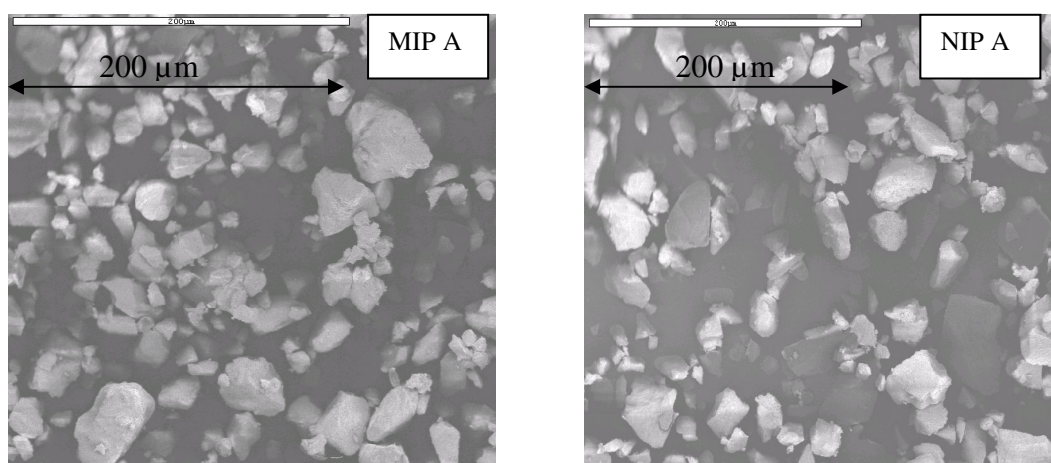


Figure III.8 : clichés MEB de MIP A et NIP A après broyage (clichés réalisés par madame A.Richard, service de microscopie électronique de l'université d'Orléans).

On remarque que la répartition en taille des particules obtenues par broyage manuel est hétérogène pour le MIP comme pour le NIP sans différence de distribution entre les deux polymères.

L'évaluation du diamètre moyen de ces particules a permis de mettre en évidence plusieurs populations : $d_p \approx 60 \mu\text{m}$, $25 \mu\text{m}$ et $< 10 \mu\text{m}$. Les fines particules $d_p < 10 \mu\text{m}$ n'ont pas été totalement éliminées par les décantations successives dans l'acétone. Ces particules de petites tailles ne sont pas retenues par les frittés en PTFE (porosité : $20 \mu\text{m}$) des cartouches SPE et peuvent ainsi contaminer les différentes phases d'élution du protocole d'extraction solide-liquide.

III.3) EVALUATION DU SUPPORT A RECONNAISSANCE MOLECULAIRE LORS DE L'EXTRACTION SOLIDE-LIQUIDE DU TAMOXIFENE

Les isothermes de Freundlich ont prouvé la formation de sites d'affinité élevée pour le tamoxifène au sein de chaque MIP préparé (A ou B). Cependant, le polymère peut aussi retenir par des interactions non spécifiques des molécules de structures différentes de celle du tamoxifène. La suppression de ces dernières est donc indispensable à l'utilisation du MIP comme matériau d'extraction spécifique du tamoxifène et de ses métabolites contenus dans des matrices urinaires.

La recapture du tamoxifène par le polymère dans différents milieux a été étudiée afin de sélectionner les solutions capables d'éliminer les interactions non spécifiques. Les interactions non spécifiques sont supposées négligeables lorsque la rétention du tamoxifène sur le NIP est nulle. Le polymère A ayant révélé, lors du tracé des isothermes de Freundlich, des interactions non spécifiques fortes avec le tamoxifène, l'étude de la sélectivité du MIP A par rapport au NIP A nous a semblé nécessaire. Les résultats obtenus pourront ensuite être appliqués au polymère B.

Puis, les MIPs A et B seront utilisés comme supports d'extraction solide-liquide avec la mise au point de protocoles propres à révéler leur spécificité d'extraction du tamoxifène et d'un de ses métabolites contenus dans des urines humaines.

III.3.1. Etude de la recapture du tamoxifène et de son principal métabolite

L'étude de la recapture du tamoxifène et du 4-hydroxytamoxifène répond à une démarche très proche de celle suivie pour le tracé des précédentes isothermes d'adsorption. La masse de MIP (ou de NIP) et la concentration en soluté restent constantes d'un batch ou lot d'échantillons à l'autre, seule la nature de la solution dans laquelle les solutés sont dissous varie. Le choix de la composition de chaque solution s'appuie sur la perspective des applications ultérieures à l'extraction solide-liquide.

a) Protocole expérimental

Dans un vial ambré (volume 1,5 mL), 1 mL d'une solution de tamoxifène (Tam) et de 4-hydroxytamoxifène (4-OH Tam) à 1 µg/mL est ajouté à 10 mg de MIP A ou NIP A. Le vial est agité pendant 3 heures puis son contenu est filtré et séché sous azote. Enfin, le résidu sec est dissous dans 1 mL de phase mobile puis analysé par CPL-UV.

b) Paramètre régulant les liaisons hydrogène

Quatre solutions de tamoxifène et 4-hydroxytamoxifène (1 µg/mL) sont préparées dans un mélange ACN / AcOH en proportions variables (% AcOH : 0 ; 0,5 ; 1 et 2). La figure III.9 reporte les fractions (% B/T) de soluté retenu en fonction de la composition de la solution.

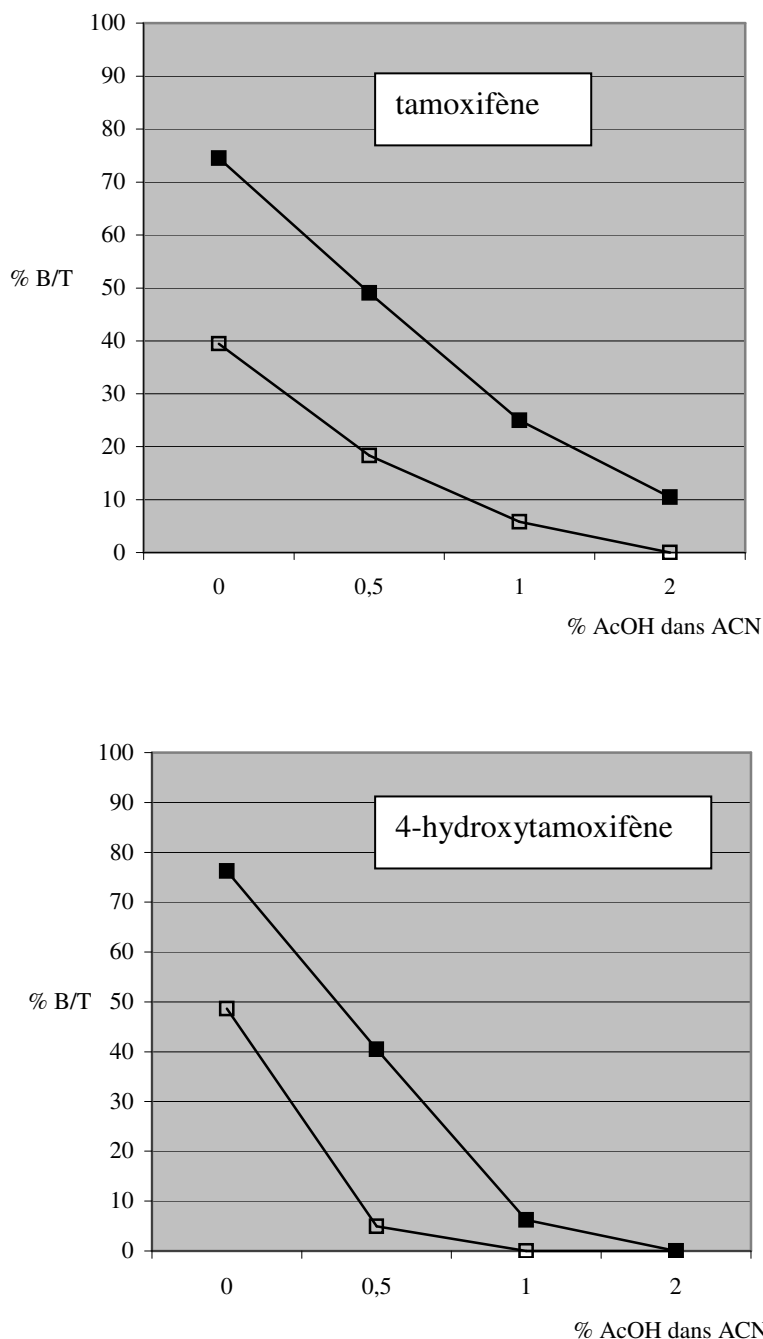


Figure III.9 : Recapture du tamoxifène et du 4-hydroxytamoxifène par le MIP A (■) et par le NIP A (□) dans ACN / AcOH avec % AcOH variable (0 ; 0,5 ; 1 et 2).

La rétention du tamoxifène et de son métabolite décroît fortement avec l'augmentation du pourcentage en acide acétique. En raison de son caractère polaire, acide et donneur - accepteur de liaisons hydrogène, l'acide acétique entre en compétition vis-à-vis des solutés avec les groupes fonctionnels de même nature (MAA) du polymère.

Comme attendu, l'acétonitrile, solvant porogène utilisé pour la synthèse du MIP, favorise la rétention du tamoxifène par le MIP (75 %) mais aussi par le NIP (40 %). Des résultats similaires sont obtenus pour le 4-hydroxytamoxifène (78 % retenus par le MIP et 50 % retenus par le NIP).

Le paramètre d'impression (P.I.) représente l'écart relatif d'adsorption du soluté sur le MIP par rapport au NIP. P.I. permet ainsi d'évaluer la sélectivité du MIP par rapport au NIP.

$$P.I. = \frac{\% B/T_{MIP} - \% B/T_{NIP}}{\% B/T_{NIP}} \quad [III.12]$$

$\%B/T_{MIP}$ et $\%B/T_{NIP}$ représentent les pourcentages de soluté retenu sur le MIP et le NIP.

Le paramètre d'impression est d'autant plus élevé que les interactions non spécifiques sont faibles et/ou les interactions spécifiques sont fortes. Les valeurs de P.I. calculées pour le tamoxifène et le 4-hydroxytamoxifène sont reportées dans le tableau III.11.

soluté % AcOH dans ACN	tamoxifène			4-hydroxytamoxifène		
	% B/T _{MIP}	% B/T _{NIP}	P.I.	% B/T _{MIP}	% B/T _{NIP}	P.I.
0	74,5	39,5	0,88	76	48,5	0,57
<u>0,5</u>	49,0	18,5	1,65	40,5	5	<u>7,10</u>
<u>1,0</u>	25,0	6	<u>3,17</u>	6	0	n.c.
2,0	10,5	0	n.c.	0	0	n.c.

Tableau III.11: Calcul du paramètre d'impression (P.I.) du tamoxifène et du 4-hydroxytamoxifène lors de leur recapture en fonction de la teneur en acide acétique dans l'acétonitrile (n.c.: non calculé).

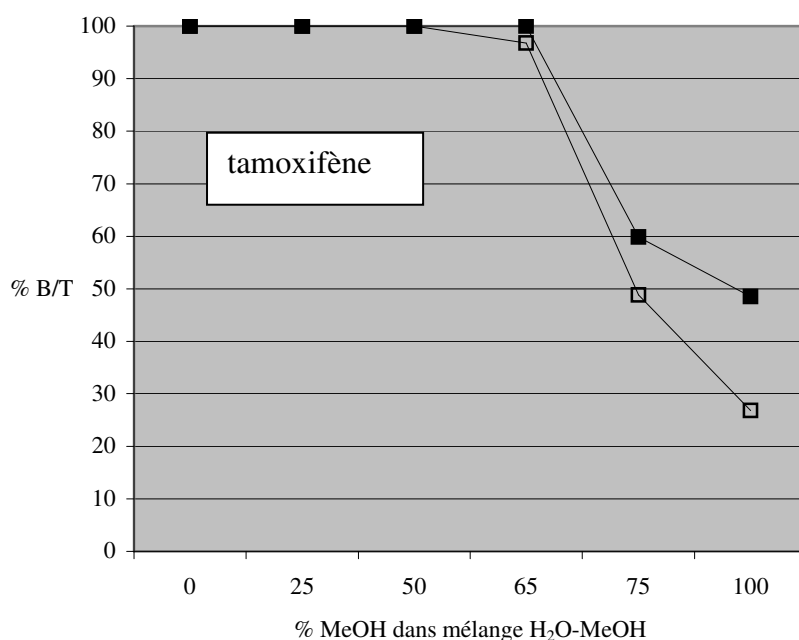
La sélectivité entre le MIP et le NIP est maximale avec une teneur de 1 % en acide acétique pour le tamoxifène (P.I. = 3,2) et avec une teneur de 0,5 % en acide acétique pour le 4-hydroxytamoxifène (P.I. = 7,1). Toutefois, une teneur de 1 % en acide acétique induit une forte diminution de la rétention sur le MIP (25 % pour le tamoxifène et 6 % pour le 4-hydroxytamoxifène).

En conclusion, le mélange ACN–AcOH 99,5-0,5 (v/v) semble concilier la rétention du tamoxifène et du 4-hydroxytamoxifène sur le MIP A ainsi qu'une sélectivité satisfaisante du MIP A par rapport au NIP A.

c) Paramètre régulant les interactions hydrophobes

Les expériences suivantes montrent l'influence de la composition d'un mélange H₂O–MeOH sur la rétention du tamoxifène et du 4-hydroxytamoxifène par le MIP et le NIP. Six solutions de tamoxifène et 4-hydroxytamoxifène (concentration 1 µg/mL) sont préparées dans un mélange H₂O–MeOH en proportions variables (% MeOH : 0 ; 25 ; 50 ; 65 ; 75 ; 100).

La figure III.10 reporte les fractions (% B/T) de soluté retenu en fonction de la composition de la solution.



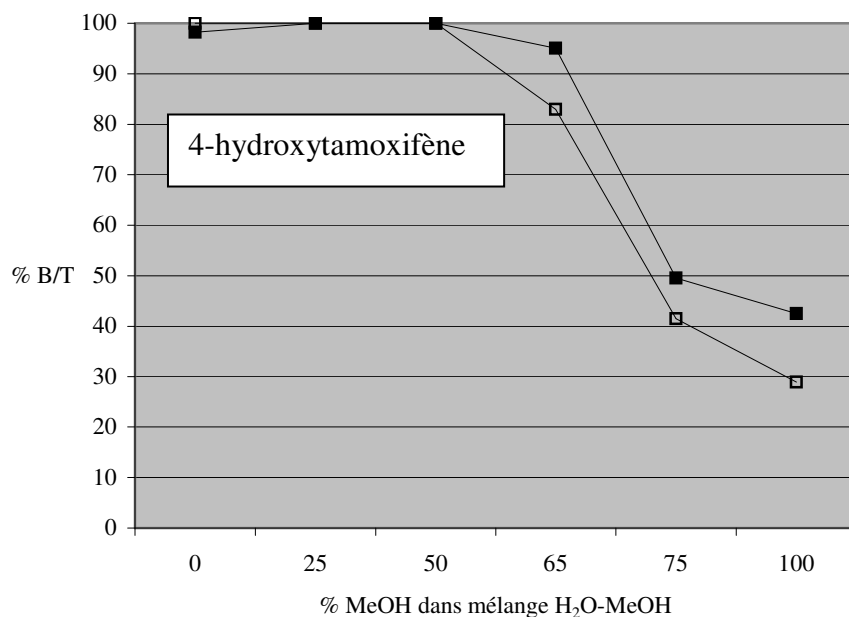


Figure III.10 : Recapture du tamoxifène et du 4-hydroxytamoxifène par le MIP A (■) et par le NIP A (□) dans un mélange H₂O / MeOH avec % MeOH variable (0 ; 25 ; 50 ; 65 ; 75 ; 100).

Une rétention totale du tamoxifène et du 4-hydroxytamoxifène est observée pour un mélange H₂O-MeOH dont la teneur en méthanol est inférieure ou égale à 50 %. Au-delà de cette teneur en méthanol, la rétention du tamoxifène et du 4-hydroxytamoxifène diminue sur le MIP et sur le NIP.

Les interactions hydrophobes évoluent avec la composition du mélange hydro-organique. Dans un mélange riche en eau, les interactions hydrophobes sont nombreuses et fortes entre le polymère et les composés organiques. Lorsque la teneur en solvant organique augmente, ces interactions hydrophobes diminuent au détriment de la rétention des solutés par le MIP et le NIP.

Dans le méthanol pur, les taux de tamoxifène et de 4-hydroxytamoxifène retenus par le MIP sont respectivement égaux à 48 et 42 %. Le méthanol pur défavorise les interactions hydrophobes et les liaisons hydrogène entre les solutés et le polymère ; on suppose donc que la rétention des solutés est due à des interactions ioniques. Les taux de tamoxifène et 4-hydroxytamoxifène retenus sont équivalents à ceux obtenus dans le mélange ACN–AcOH 99,5-0,5 (v/v). En revanche, la sélectivité du MIP par rapport au NIP est inférieure puisque les valeurs de P.I. obtenues dans le méthanol pur sont respectivement égales à 0,81 pour le tamoxifène et 0,47 pour le 4-hydroxytamoxifène.

En conclusion, l'augmentation de la teneur en méthanol diminue la rétention des solutés par disparition progressive des interactions hydrophobes sans révéler de sélectivité du MIP A par rapport au NIP A satisfaisante.

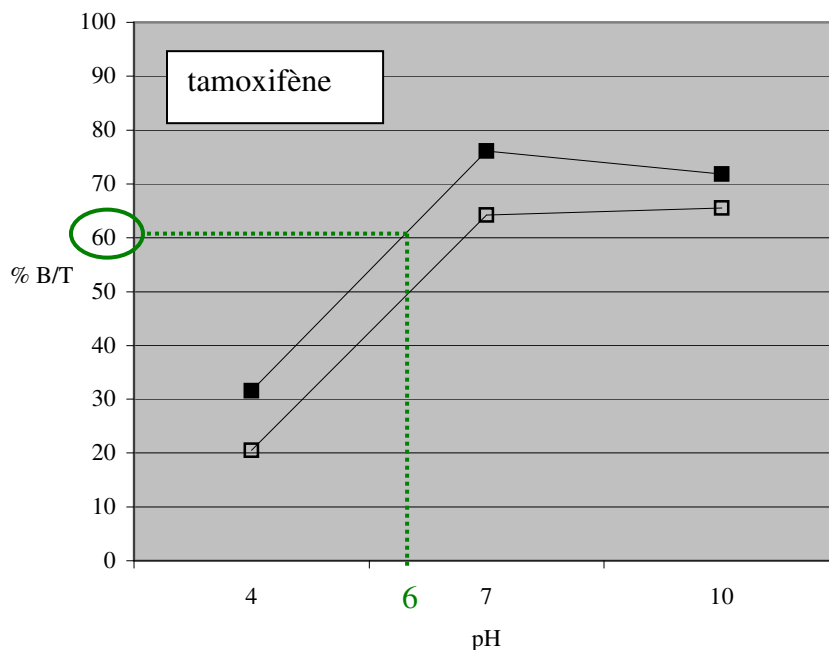
d) Paramètre régulant les interactions ioniques

Afin de compléter les résultats précédents sur la rétention du tamoxifène et du 4-hydroxytamoxifène par interactions ioniques, une étude a été réalisée à différentes valeurs de pH (4, 7 et 10) dans un mélange MeOH-tampon (pH variable) 75-25 (v/v).

Cette composition du mélange hydro-organique a été choisie de façon à diminuer les interactions hydrophobes.

La force ionique est faible (5 mM) afin de limiter la compétition ionique du tampon vis-à-vis des solutés et du polymère. La composition des tampons est reportée en annexe XIV.

La figure III.11 reporte les fractions (% B/T) de soluté retenu en fonction du pH de la solution.



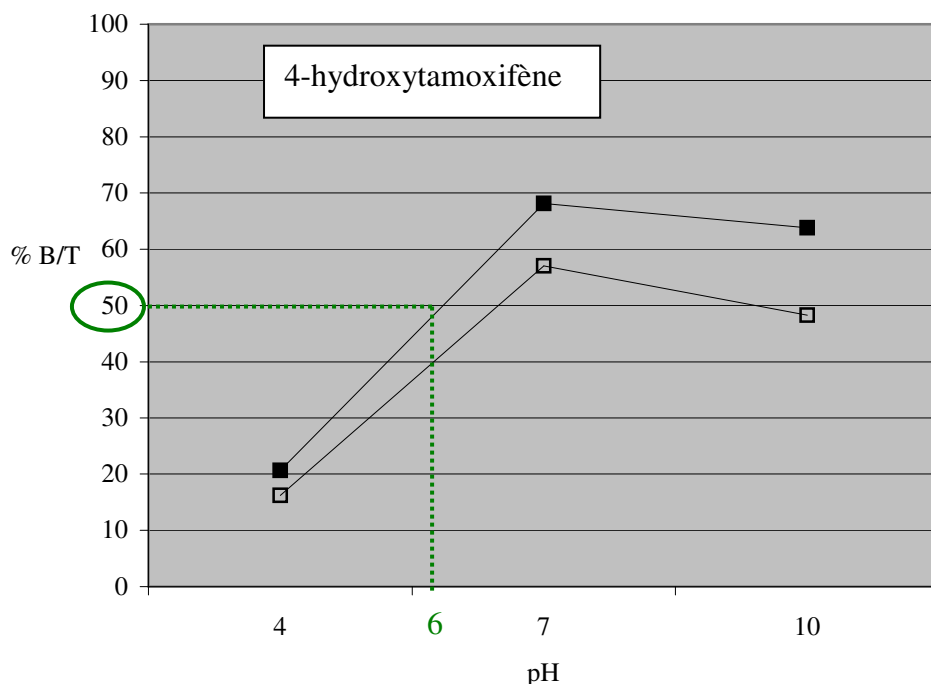


Figure III.11 : Recapture du tamoxifène et du 4-hydroxytamoxifène par le MIP A (■) et par le NIP A (□) dans un mélange MeOH / tampon (pH 4, 7, 10 ; l = 5 mM) 75/25 (v/v). Tampon remplacé par H₂O, pH 6 (Figure III.10).

Les quantités de tamoxifène et 4-hydroxytamoxifène retenues augmentent de pH 4 à 7 puis diminuent légèrement à pH 10.

Les résultats ne révèlent pas d'évolution significative de la sélectivité entre le MIP et le NIP en fonction du pH ; en effet, les valeurs de P.I. sont toujours inférieures à 1 quel que soit le pH.

Le pH du mélange hydro-organique favorise les formes acide ou basique de l'acide méthacrylique ($pK_A \approx 6,9$ dans MeOH / H₂O 75/25 (v/v)) et du tamoxifène ($pK_A \approx 8,8$ dans MeOH / H₂O 75/25 (v/v)). Le tableau III.12 récapitule les formes acide/base majoritairement présentes de ces molécules selon le pH mesuré dans l'eau et dans le mélange hydro-organique.

pH_{H_2O} (pH_{MeOH/H_2O} 75/25 (v/v))	Formes acide/base majoritaires	Interactions ioniques
4 (5,5)	<p>tamoxifène MAA</p>	NON

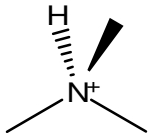
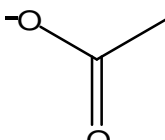
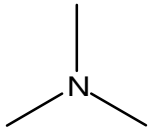
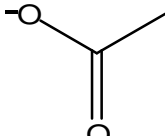
7 (7,4)	 tamoxifène	 MAA	OUI
10 (9,5)	 tamoxifène	 MAA	NON

Tableau III.12: Formes acide / base majoritaires du tamoxifène et de l'acide méthacrylique à différents pH.

Le pH 7 est favorable aux interactions ioniques entre le tamoxifène et l'acide méthacrylique. Des résultats similaires ont été obtenus lors de la recapture du propranolol (base faible, amine secondaire) par un polymère contenant de l'acide méthacrylique [42].

A pH 4, le tamoxifène, sous forme cationique, ne présente aucune interaction ionique avec le polymère neutre. Le caractère ionique du tamoxifène favorise la solubilité de ce soluté dans le solvant polaire.

A pH 10, le tamoxifène, sous forme majoritairement neutre, ne présente aucune interaction ionique avec le polymère dont les fonctions MAA sont ionisées. La rétention du tamoxifène est due aux interactions hydrophobes.

La discussion menée sur le comportement du tamoxifène dans différentes solutions est applicable au 4-hydroxytamoxifène, ces deux molécules ayant des pK_A et des hydrophobies équivalents.

En conclusion, dans un mélange MeOH / H₂O, la rétention du tamoxifène et celle du 4-hydroxytamoxifène sont favorisées par interactions ioniques à pH 7, et par liaisons hydrophobes à un pH supérieur à 7.

e) Conclusion

Bien que les résultats tirés des expériences de recapture aient été obtenus dans des conditions thermodynamiques, ils renseignent sur la nature des phases de lavage à utiliser lors de l'extraction SPE d'une urine dopée en tamoxifène et 4-hydroxytamoxifène.

On retiendra que :

- Dans la gamme 0 – 1 % d'AcOH dans ACN, l'augmentation de la teneur en acide améliore le paramètre d'impression mais diminue la rétention du soluté sur le MIP A et le NIP A. Une teneur de 0,5 % en AcOH semble être un compromis acceptable pour le tamoxifène et le 4-hydroxytamoxifène.
- La teneur en MeOH régule les interactions hydrophobes sur le MIP.
- Le pH 7 favorise les interactions ioniques entre la molécule ciblée et le monomère fonctionnel, totalement ionisés.

III.3.2. Etude d'un MIP à un seul monomère fonctionnel MAA (MIP A)

III.3.2.1. Réalisation d'une SPE seule sur MIP A

A partir des résultats relatifs à la rétention et à la sélectivité du MIP dans différentes solutions, un protocole SPE appliqué à une solution standard puis à de l'urine dopée est mis au point. La procédure établie tient compte des contraintes imposées par la matrice urinaire, chargée en sels et en molécules organiques polaires (Annexe XIII).

a) Cas d'une solution standard de tamoxifène

Le travail réalisé sur la solution standard a pour objectif d'évaluer la rétention sélective du tamoxifène par le MIP lors des différentes étapes de lavage. La sélectivité de l'extraction sera évaluée en appliquant le même protocole SPE au MIP et au NIP.

a-1) Protocole expérimental

Deux cartouches en polypropylène ISOLUTE (IST, Hengoed Midglamorgan, UK) sont respectivement remplies de 60 mg de MIP A et 60 mg de NIP A. Chacune d'elles a un volume de 1 mL et la phase stationnaire est retenue par deux frittés en polyéthylène (porosité 20 µm). Le protocole SPE est réalisé sur un module d'extraction sous vide à 12 voies Visiprep (Supelco, Sigma-Aldrich, St Quentin-Fallavier, France). Chaque fraction (dépôt, lavage et élution) est séchée sous azote puis dissoute dans 1 mL de phase mobile avant d'être analysée par chromatographie en phase liquide avec détection UV.

Le même protocole, nommé PROTOCOLE 1, a été répété sur deux cartouches de MIP A et deux cartouches de NIP A préparées dans les mêmes conditions. Les étapes SPE sont résumées dans le tableau III.13:

Etape	Composition du mélange	Volume (mL)
Conditionnement	1) MeOH	4
	2) ACN	4
	3) tampon NH ₂ OH-AcOH (pH 7, I = 10 mM)	4
Dépôt	tamoxifène (0,5 µg/mL) dissous dans tampon NH ₂ OH-AcOH (pH 7, I = 10 mM)	2
Lavage 1	H ₂ O	2
Lavage 2	MeOH / H ₂ O 50/50 (v/v)	2
Lavage 3	ACN	3
Lavage 4	ACN / AcOH 99,5/0,5 (v/v)	3
Elution	MeOH / AcOH 90/10 (v/v)	4

Tableau III.13: Protocole SPE appliqué au MIP A et au NIP A à partir d'une solution standard de tamoxifène à 0,5 µg/mL (**PROTOCOLE 1**).

a-2) Résultats

Etape de conditionnement: Les deux premières étapes de conditionnement nettoient le polymère de ses produits de décomposition. Elles utilisent les solvants retrouvés dans les étapes de lavage qui suivront, et activent le polymère par interactions hydrophobes. La dernière étape du conditionnement prépare le polymère à la rétention du tamoxifène par activation des sites échangeurs d'interactions ioniques (MAA).

Etape de dépôt: 1 µg de tamoxifène dissous dans un tampon pH 7 est déposé sur 60 mg de MIP (et 60 mg de NIP). Les expériences de recapture sous contrôle thermodynamique ont montré la rétention totale du tamoxifène déposé dans de l'eau, grâce aux interactions hydrophobes et ioniques. Ces interactions ioniques sont favorisées par un tampon pH 7. Ce dernier, préparé à partir d'hydroxylamine et d'acide acétique, est volatil et doté d'un pouvoir tampon élevé.

L'histogramme de la figure III.12 montre une rétention totale du tamoxifène lors du dépôt sur le MIP et sur le NIP.

Etapes de lavage:

- Le lavage 1 (H₂O) permet l'élimination des espèces polaires (urée, créatinine, acide urique, acide hippurique) de la matrice urinaire. Le tamoxifène est totalement retenu par le MIP ainsi que par le NIP grâce aux interactions hydrophobes et ioniques.

- Le lavage 2 (MeOH / H₂O 50/50 (v/v)) [43-44] permet d'éliminer les urobilines, pigments jaunes qui colorent la cartouche.

Par élimination d'espèces de la matrice urinaire susceptibles de créer des liaisons hydrogène avec le polymère, les étapes 1 et 2 assurent la rétention du tamoxifène par les empreintes du MIP au cours des lavages suivants (3 et 4).

- Le lavage 3 (ACN) permet d'éluer des molécules apolaires telles que les hormones.

Au cours d'applications des MIPs à la SPE reportées dans la littérature, l'acétonitrile a déjà été utilisé comme phase de lavage [28,45-46]. Le caractère aprotique de l'acétonitrile favorise les liaisons hydrogène entre les molécules recherchées et les empreintes formées à partir d'acide méthacrylique. De plus, l'acétonitrile, solvant porogène utilisé pour la synthèse du MIP, favorise la reconnaissance de forme du tamoxifène par les empreintes. Si les résultats obtenus avec la solution standard montrent une rétention totale du tamoxifène par le MIP, ce solvant ne réussit pas à rompre les interactions non spécifiques du tamoxifène avec le polymère (voir la rétention totale sur le NIP).

- Le lavage 4 (ACN / AcOH 99,5/0,5 (v/v)) permet de révéler la sélectivité du MIP par rapport au NIP. L'acide acétique favorise la rupture des interactions non spécifiques, conformément aux expériences de recapture. Ainsi, 91 % du tamoxifène sont élués du NIP pour seulement 7 % du MIP.

Ce type de lavage (ACN / AcOH, % V_{AcOH} : 1-5 %) avait déjà apporté des résultats satisfaisants pour l'extraction d'antibiotiques d'urine, avec un recouvrement final de 80 % [43]. Toujours dans les mêmes conditions, un lavage efficace de la matrice a été réalisé lors de l'extraction sélective de β -agonistes contenus dans l'urine de veau [47] avec un recouvrement faible (50 %). En effet, il importe de ne pas négliger la force éluante du mélange ACN / AcOH et de fixer avec soin sa composition et son volume percolé à travers le MIP.

Etape d'élution: La phase d'élution (MeOH / AcOH 90/10 (v/v)) est volontairement acide et à fort caractère donneur de liaisons hydrogène afin d'éluer quantitativement le tamoxifène. 4 mL de MeOH / AcOH 90/10 (v/v) éluent totalement le tamoxifène avec un recouvrement de 93 % sur le MIP, soit un recouvrement global de 100 % pour la procédure SPE.

Le pourcentage de tamoxifène (6 %) récupéré sur le NIP lors de cette étape représente le pourcentage d'interactions non spécifiques participant au mécanisme de rétention du tamoxifène sur le MIP.

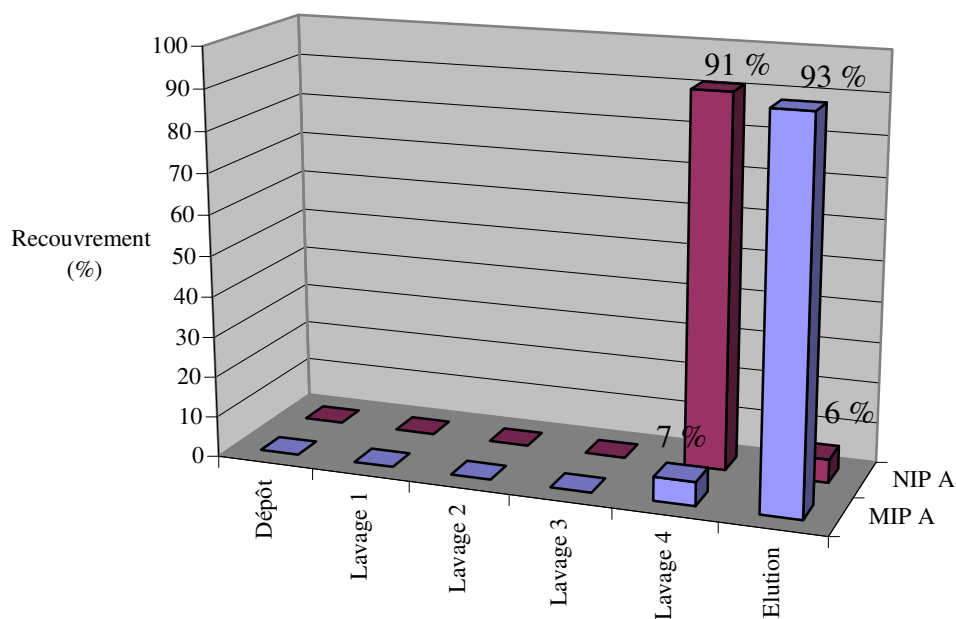


Figure III.12: Recouvrements obtenus pour une solution standard de tamoxifène déposée sur deux cartouches SPE MIP A et NIP A (60 mg), **PROTOCOLE 1**.

Chaque étape du protocole SPE a été optimisée de manière à éliminer les espèces interférentes de la matrice. Le recouvrement de 93 % en tamoxifène à l'élution permet d'envisager une extraction quantitative du tamoxifène contenu dans l'urine.

b) Cas d'une urine dopée au tamoxifène

Une urine diluée à moitié par le tampon $\text{NH}_2\text{OH} - \text{AcOH}$ (pH 7, $I = 50 \text{ mM}$) est dopée par le tamoxifène ($0,5 \mu\text{g/mL}$) puis déposée sur le MIP et soumise au **PROTOCOLE 1** de SPE. Le pH de la solution de dépôt est fixé à 7 afin de favoriser les interactions ioniques tamoxifène – polymère. En effet, l'urine contient des composés acido-basiques (NH_4^+ , H_2PO_4^- , acide urique, acide hippurique) dont les concentrations imposent le pH de l'urine ($5 < \text{pH} < 7$). Le tampon $\text{NH}_2\text{OH} - \text{AcOH}$ (pH 7, 50 mM) a un pouvoir tampon élevé ($\beta = 103 \text{ mM/pH}$). La dilution de l'urine dans une solution tampon avait déjà été mise en place lors de l'extraction sélective de dérivés du diphenylphosphate sur un MIP [44].

D'autre part, certaines urines fortement chargées en sels sont très visqueuses et leur dilution (1/1) diminue la viscosité.

- Les lavages 1 (H₂O) et 2 (MeOH / H₂O 50/50 (v/v), 3 mL) sont identiques à ceux décrits précédemment et permettent d'éliminer les espèces très polaires et les urobilines contenues dans la matrice urinaire.

- Le lavage 3 (ACN, 4 mL) révèle la sélectivité du MIP par rapport au NIP. Le tamoxifène est totalement retenu par le MIP alors qu'une proportion importante (34 %) du tamoxifène est éluée du NIP. Ce résultat, différent de celui observé avec la solution standard, s'explique par la présence d'ions minéraux, en forte concentration dans l'urine, que les précédents lavages n'ont pas totalement éliminés. Les nombreuses interactions ioniques entre les ions Na⁺ (K⁺ et Ca²⁺) et MAA⁻ affaiblissent la rétention du tamoxifène par diminution des interactions ioniques et des liaisons hydrogène entre le tamoxifène et le polymère. De telles observations ont déjà été rapportées [44,48].

Toutefois, le MIP est capable de retenir le tamoxifène grâce aux interactions avec les sites de reconnaissance de forme.

- Le lavage 4 (ACN / AcOH 99,8/0,2 (v/v), 4 mL) poursuit sur le NIP l'éluion du tamoxifène. Le mélange utilisé pour la solution standard s'est avéré être trop éluant avec l'urine, probablement à cause de la présence des ions minéraux compétiteurs. Aussi, le pourcentage d'acide acétique a été abaissé à 0,2 %.

Ainsi, les étapes de lavage 3 et 4 éliminent 84 % du tamoxifène sur le NIP mais en retiennent 96 % sur le MIP.

- Finalement, l'étape d'éluion (MeOH / AcOH 90/10 (v/v)) appliquée au MIP permet de récupérer 90 % du tamoxifène présent dans l'urine. Les étapes de lavage sont satisfaisantes car elles permettent de limiter le développement des interactions non spécifiques (12 %).

Les recouvrements obtenus à chaque étape SPE sont reportés dans l'histogramme de la figure III.13.

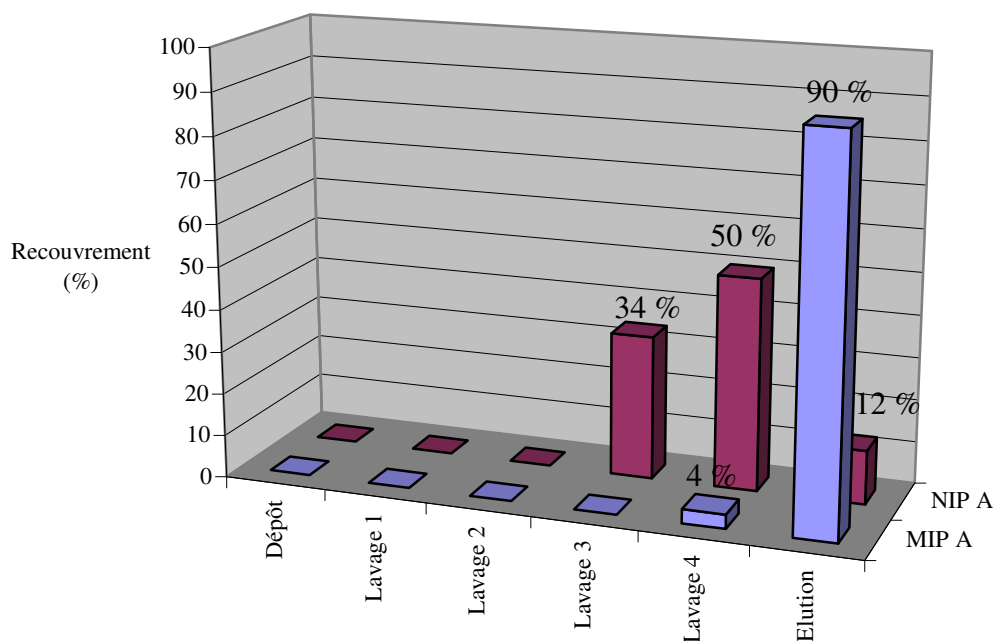


Figure III.13: Recouvrements obtenus lors des différentes étapes d'extraction du tamoxifène sur le MIP A et le NIP A. Echantillon: tamoxifène (0,5 µg/mL). Solvant de l'échantillon: urine / tampon NH₂OH-AcOH (pH 7, I = 50 mM) 50/50 (v/v), **PROTOCOLE 1**.

La figure III.14 compare deux modes de prétraitement d'une urine dopée au tamoxifène : extraction SPE sur le MIP A et extraction LLE (CHCl₃). La matrice de l'urine est nettement éliminée avec le MIP alors que cette dernière est encore présente en quantité non négligeable après l'extraction liquide-liquide. Toutefois, un pic caractéristique du relargage du MIP (2,7 min), différent du pic de la molécule empreinte, apparaît après la SPE.

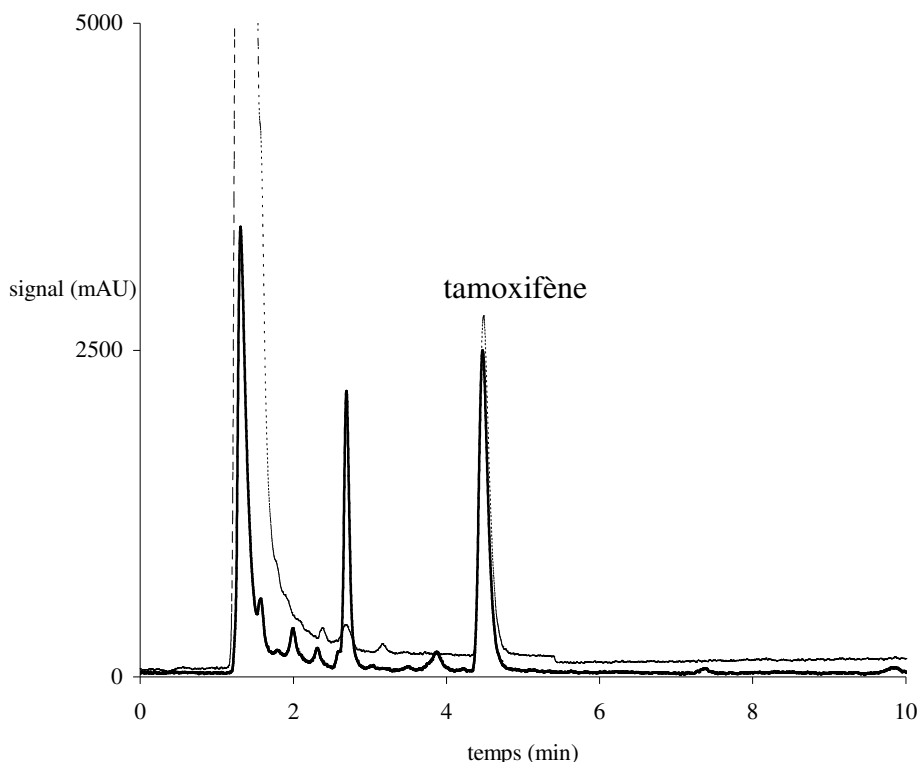


Figure III.14: Comparaison de deux modes de prétraitement d'un échantillon d'urine dopée au tamoxifène (0,5 µg/mL) : extraction LLE (pointillés) ; extraction SPE sur le MIP A (trait plein), **PROTOCOLE 1**. Analyse par CPL – UV (240 nm), annexe XI.

c) Cas d'une urine hydrolysée, dopée au tamoxifène et au 4-hydroxytamoxifène

Dans les urines de sportifs dopés, les métabolites du tamoxifène sont sous forme glucuroconjuguée [9] et une étape préalable d'hydrolyse enzymatique de l'urine avec l'enzyme β -glucuronidase est nécessaire (Annexe XV).

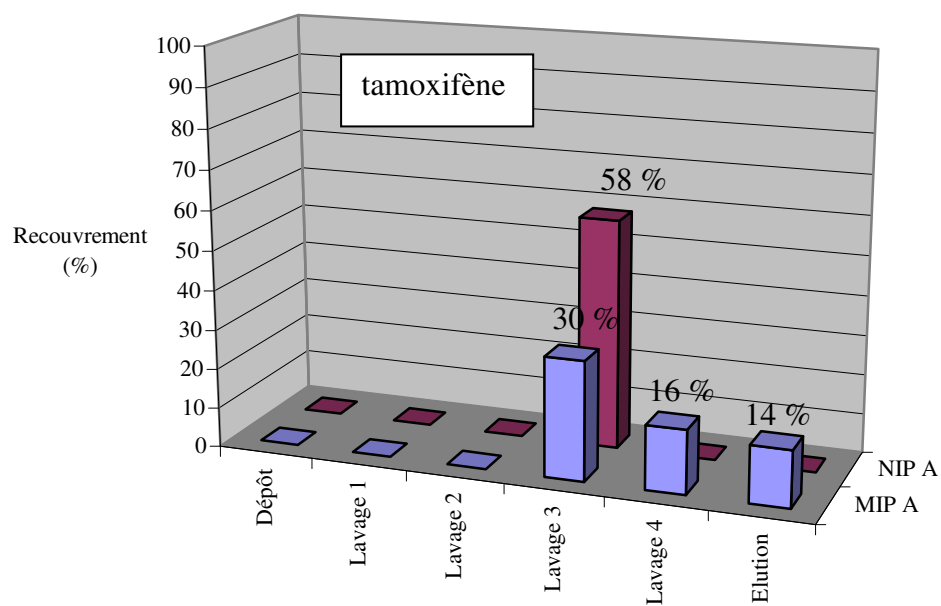
Le protocole SPE, mis au point précédemment avec de l'urine non hydrolysée, est testé maintenant avec de l'urine hydrolysée.

c-1) Protocole SPE

L'urine hydrolysée est dopée par le tamoxifène (0,25 µg/mL) et le 4-hydroxytamoxifène (0,25 µg/mL) puis diluée par deux avec le tampon $\text{NH}_2\text{OH-AcOH}$ (pH 7, I = 50 mM). Un volume de 8 mL d'échantillon est déposé sur la cartouche SPE (soit 1 µg de tamoxifène et 1 µg de 4-hydroxytamoxifène). Après séchage sous azote, 1 mL de phase mobile redissout le contenu de chaque fraction SPE (facteur de concentration égal à 8).

c-2) Résultats

La figure III.15 indique clairement que le protocole SPE mis au point sur une urine non hydrolysée est inopérant avec une urine hydrolysée.



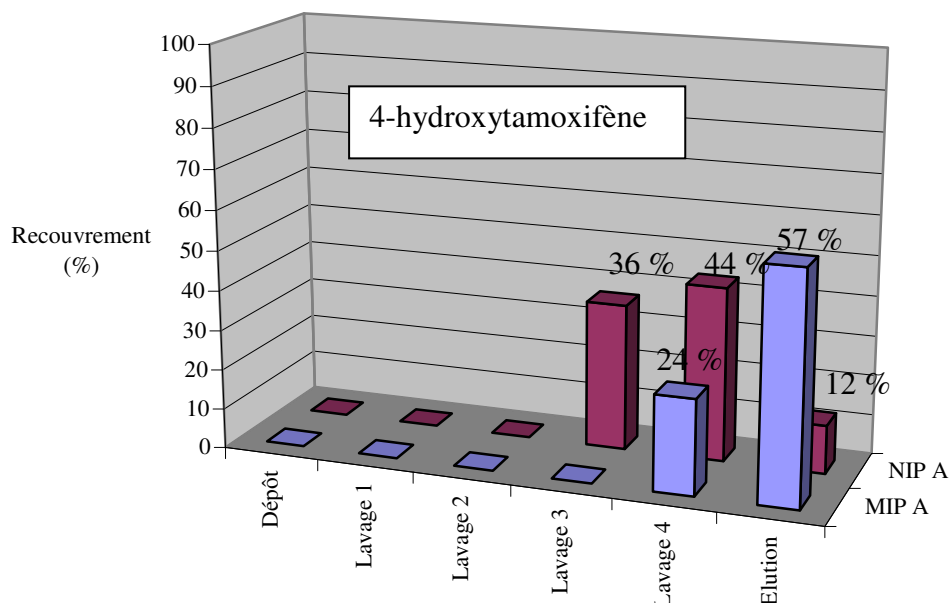


Figure III.15: Recouvrements obtenus lors des différentes étapes d'extraction du tamoxifène et du 4-hydroxytamoxifène sur le MIP A et le NIP A. Echantillon: tamoxifène (0,125 µg/mL) et 4-hydroxytamoxifène (0,125 µg/mL). Solvant de l'échantillon: urine hydrolysée / tampon NH₂OH-AcOH (pH 7, I = 50 mM) 50/50 (v/v). **PROTOCOLE 1.**

- A l'élution, les recouvrements du tamoxifène (14 %) et du 4-hydroxytamoxifène (57 %), sont nettement insuffisants. Le tamoxifène est relargué du MIP dès le lavage 3 (30 %) tandis que le 4-hydroxytamoxifène l'est dès le lavage 4 (24 %). En effet, la quantité d'urine déposée sur le MIP (et le NIP) est quatre fois supérieure à ce qu'elle était dans l'expérience précédente, ceci augmente d'autant l'apport en ions (Na⁺, K⁺ et Cl⁻) et en espèces polaires à caractères donneur et accepteur de liaisons hydrogène. Au cours des deux premiers lavages, l'élimination incomplète de ces compétiteurs ioniques sont la cause d'une diminution des interactions ioniques et des liaisons hydrogène entre les molécules ciblées (tamoxifène et son métabolite) et les sites d'adsorption du polymère.

- Il est à noter que le recouvrement global du tamoxifène atteint 60 % en raison d'une perte probable de ce soluté au cours du lavage 2, dont la fraction recueillie n'a pas pu être analysée à cause de sa trop forte salinité.

- Le chromatogramme de la figure III.16 prouve la très bonne efficacité de l'extraction SPE sur le MIP A pour éliminer la matrice urinaire comparée au processus LLE. D'ailleurs, l'analyse de la fraction LLE montre un grand nombre de pics attribués aux espèces libérées

lors de l'hydrolyse enzymatique, notamment des hormones telles que l'étiocolanolone et l'androstérone, identifiées par CPG/SM au laboratoire d'analyses de l'afl.

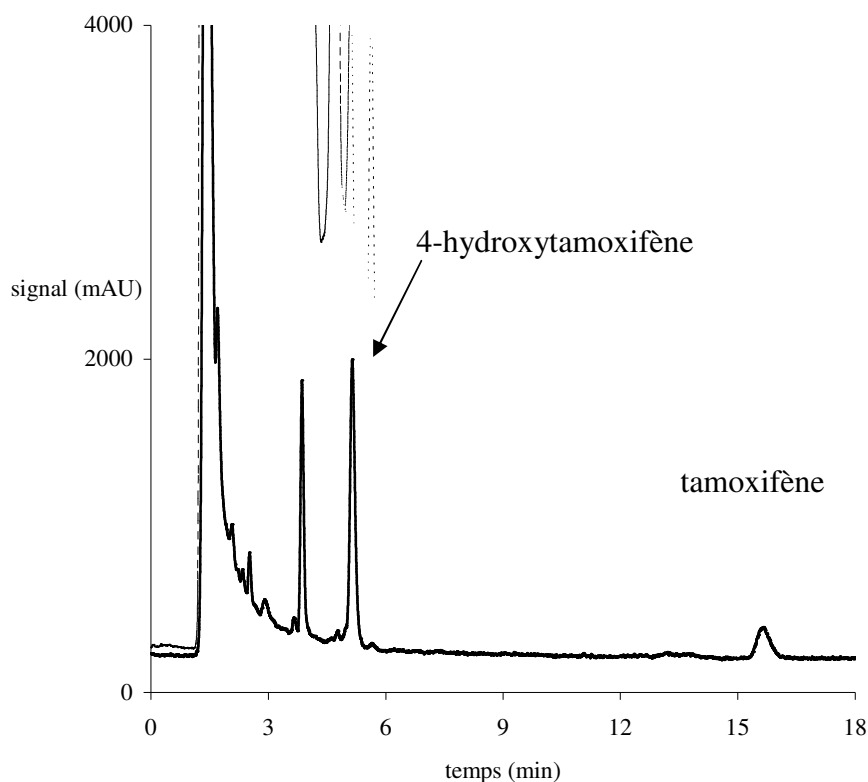


Figure III.16: Comparaison de deux modes de prétraitement d'un échantillon d'urine hydrolysée et dopée au tamoxifène (0,25 µg/mL) et au 4-hydroxytamoxifène (0,25 µg/mL) : extraction LLE (pointillés) ; extraction SPE sur le MIP A (trait plein), **PROTOCOLE 1**. Analyse par CPL – UV (240 nm), annexe XI.

L'hypothèse de l'influence des sels minéraux résiduels sur l'élution prématurée des solutés est confirmée par les résultats obtenus lors de l'extraction sur le MIP A et le NIP A d'un échantillon constitué de tamoxifène et 4-hydroxytamoxifène dissous dans une solution tampon PBS pH 7 très concentrée en sels (4 mM KCl et 153 mM NaCl). Les résultats reportés dans l'annexe XVIII montrent l'absence de sélectivité du MIP par rapport au NIP pour les deux molécules recherchées, majoritairement éliminées du MIP et du NIP au cours des lavages 3 et 4.

d) Conclusion

Le protocole SPE (**PROTOCOLE 1**) établi à partir d'une solution standard de tamoxifène puis d'une urine dopée a donné des résultats encourageants.

Ces derniers n'ont été que partiellement retrouvés lors de la SPE réalisée sur une urine hydrolysée et déposée en quantité plus importante sur le MIP. En effet, si l'élimination de la

matrice est efficace, la préconcentration de l'échantillon entraîne de faibles recouvrements du tamoxifène et du 4-hydroxytamoxifène à l'élution. Une étape préalable d'élimination des sels de la matrice urinaire par SPE sur une cartouche polymérique hydrophobe est alors envisagée.

III.3.2.2 Réalisation de deux SPE successives sur HLB et MIP A

L'objectif poursuivi dans cette étape est de déposer sur le MIP un échantillon urinaire exempt de sels minéraux. Une première extraction SPE est réalisée sur une cartouche capable de retenir les espèces hydrophobes (tamoxifène, 4-hydroxytamoxifène, hormones) et d'éliminer les sels présents dans la matrice urinaire. Après élution et séchage, l'extrait sera récupéré dans un solvant organique (acétonitrile) puis déposé sur le polymère à empreintes moléculaires.

Le choix de la phase stationnaire, dans la première étape SPE, s'est porté sur un support polymérique de type HLB pour deux raisons :

1- Le polymère HLB (Annexe XVI) contient des groupements divinylbenzène capables de retenir des molécules contenant des noyaux aromatiques par interactions de type π - π ainsi que par liaisons hydrophobes. Les groupements hydrophiles N-vinylpyrrolidone de la phase HLB interagissent avec la fonction amine du tamoxifène indépendamment du pH de la solution [49]. Ces conditions sont propices à la rétention du tamoxifène et du 4-hydroxytamoxifène.

2- La cartouche HLB est reconnue pour sa capacité élevée due essentiellement à sa surface spécifique ($831 \text{ m}^2/\text{g}$).

Des travaux publiés sur l'extraction de quinolones fluorées dans l'urine à partir d'une SPE combinée HLB-MIP confirment ce choix [43]. Dans ce cas, 25 mL d'urine ont été directement déposés sur une cartouche HLB (3 mL, 60 mg). Le recouvrement final obtenu après la deuxième SPE s'élève à 80 % pour la molécule recherchée (enrofloxacin).

Une démarche similaire a été suivie pour l'extraction d'acides alkyl méthylphosphoniques de matrices aqueuses complexes, des rendements d'extraction de 95 % ont été obtenus pour les molécules ciblées après une SPE combinée HLB-MIP [50].

a) Protocole d'une SPE combinée HLB-MIP

Le PROTOCOLE 2 de SPE appliqué à une urine hydrolysée et dopée au tamoxifène et au 4-hydroxytamoxifène combine une extraction SPE sur une cartouche HLB suivie d'une

extraction SPE sur une cartouche MIP A. Les détails du protocole sont reportés dans les tableaux III.14 et III.16.

a-1) Première étape de la SPE combinée: extraction du tamoxifène et du 4-hydroxytamoxifène sur cartouche HLB

Etape	Composition	Volume (mL)
Conditionnement	1) MeOH	4
	2) H ₂ O	4
Dépôt	tamoxifène (0,125 µg/mL) et 4-hydroxytamoxifène (0,125 µg/mL) dans l'urine hydrolysée diluée 1/1 (v/v) dans H ₂ O	8
Lavage	H ₂ O	4
Elution	MeOH	4

Tableau III.14: Protocole SPE sur une cartouche HLB (1 mL, 30 mg) appliqué à de l'urine hydrolysée et dopée au tamoxifène et au 4-hydroxytamoxifène. Première étape du **PROTOCOLE 2**.

La fraction d'élution est séchée sous azote. L'extrait sec est dissous dans 2,5 mL d'acétonitrile (concentrations théoriques en tamoxifène et 4-hydroxytamoxifène de 0,4 µg/mL). L'échantillon initial a été préconcentré d'un facteur 3,2. Les recouvrements en tamoxifène et 4-hydroxytamoxifène à l'élution ont été évalués de deux façons:

1- par CPL-UV (240 nm), en prenant comme étalon externe une solution de concentration connue en tamoxifène et 4-hydroxytamoxifène (0,4 µg/mL).

2- par CPL-SM/SM (Annexe XVII), en prenant comme étalon externe la fraction d'élution d'un blanc urinaire, dopée ensuite en tamoxifène et 4-hydroxytamoxifène (0,4 µg/mL).

Le tableau III.15 reporte les recouvrements à l'élution obtenus avec les deux méthodes.

Recouvrement à l'élution (%)	SM/SM	UV à 240 nm Etalon externe (0,4 µg/mL)
	Etalon externe: blanc urinaire dopé après SPE tamoxifène $m/z : 372 \rightarrow 72$ 4-hydroxytamoxifène $m/z : 388 \rightarrow 72$	
tamoxifène	80	82
4-hydroxytamoxifène	84	82

Tableau III.15: Recouvrements obtenus pour le tamoxifène et le 4-hydroxytamoxifène à l'élution de la première SPE sur cartouche HLB.

Les recouvrements sont supérieurs à 80 % et de valeurs concordantes. L'extrait organique issu de la SPE-HLB peut alors être déposé sur le MIP.

a-2) Seconde étape de la SPE combinée: extraction du tamoxifène et du 4-hydroxytamoxifène sur le MIP A

La même procédure décrite dans le tableau III.16 est appliquée simultanément sur les deux cartouches SPE remplies respectivement par 60 mg de MIP A et 60 mg de NIP A.

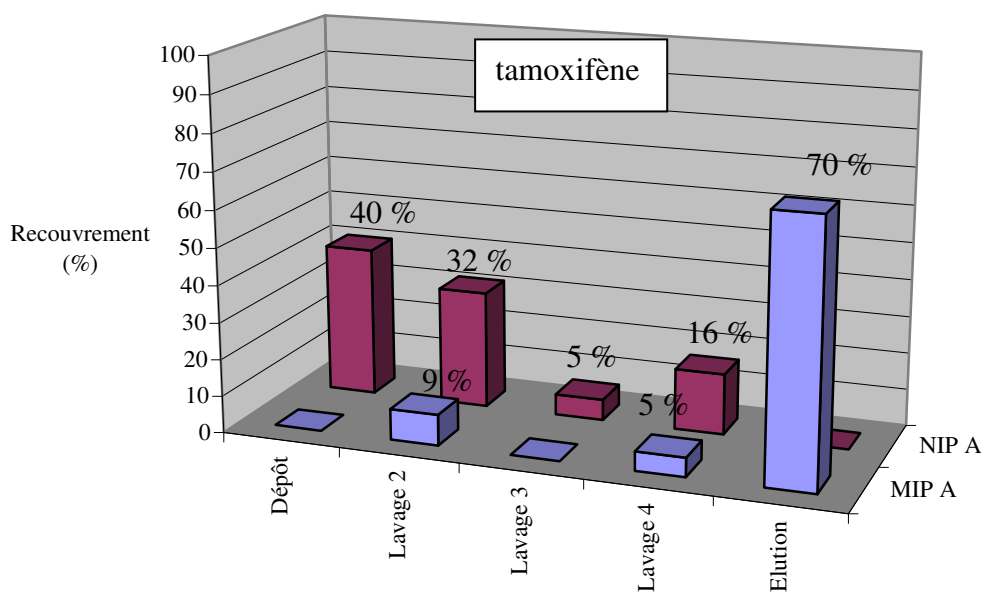
Etape	Composition du mélange	Volume (mL)
Conditionnement	1) MeOH	4
	2) ACN	4
Dépôt	Elution HLB: tamoxifène (0,4 µg/mL) et 4-hydroxytamoxifène (0,4 µg/mL) dans ACN	2
Lavage 1	H₂O	0
Lavage 2	MeOH / H ₂ O 50/50 (v/v)	3
Lavage 3	ACN	4
Lavage 4	ACN / AcOH 99,8/0,2 (v/v)	4
Elution	MeOH / AcOH 90/10 (v/v)	4

Tableau III.16: Protocole SPE sur le MIP A et le NIP A appliqué à la fraction éluée lors de la SPE-HLB. Seconde étape du **PROTOCOLE 2**.

Le lavage 1 (H₂O) a été supprimé compte tenu de l'élimination des sels minéraux et des molécules très polaires dans la première extraction sur la cartouche HLB. Le lavage 2 (MeOH / H₂O 50/50 (v/v)) élimine les molécules moyennement polaires (urobilines). Les lavages 3 et

4 ainsi que l'éluion sont maintenus identiques à ceux mis en place dans les précédentes expériences.

Les histogrammes de la figure III.17 reportent les recouvrements obtenus lors de cette seconde extraction réalisée sur le MIP A et sur le NIP A.



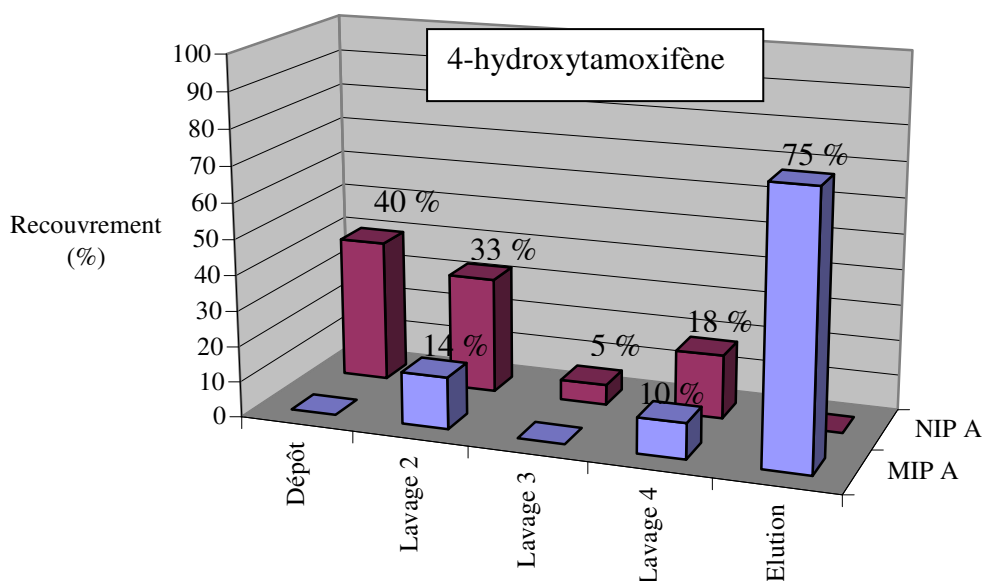


Figure III.17: Recouvrements obtenus pour la seconde étape du **PROTOCOLE 2** appliquée à de l'urine hydrolysée et dopée.

b) Commentaires

Les recouvrements obtenus à l'élution du MIP sont satisfaisants pour le tamoxifène (70 %) et pour le 4-hydroxytamoxifène (75 %) avec une sélectivité élevée puisque les recouvrements en tamoxifène et 4-hydroxytamoxifène sont nuls à l'élution du NIP.

D'autre part, la superposition des chromatogrammes de l'élution SPE-HLB et de l'élution du MIP montre l'efficacité du MIP à éliminer la matrice de l'urine tout en retenant spécifiquement et quantitativement le tamoxifène et son métabolite (**Figure III.18**).

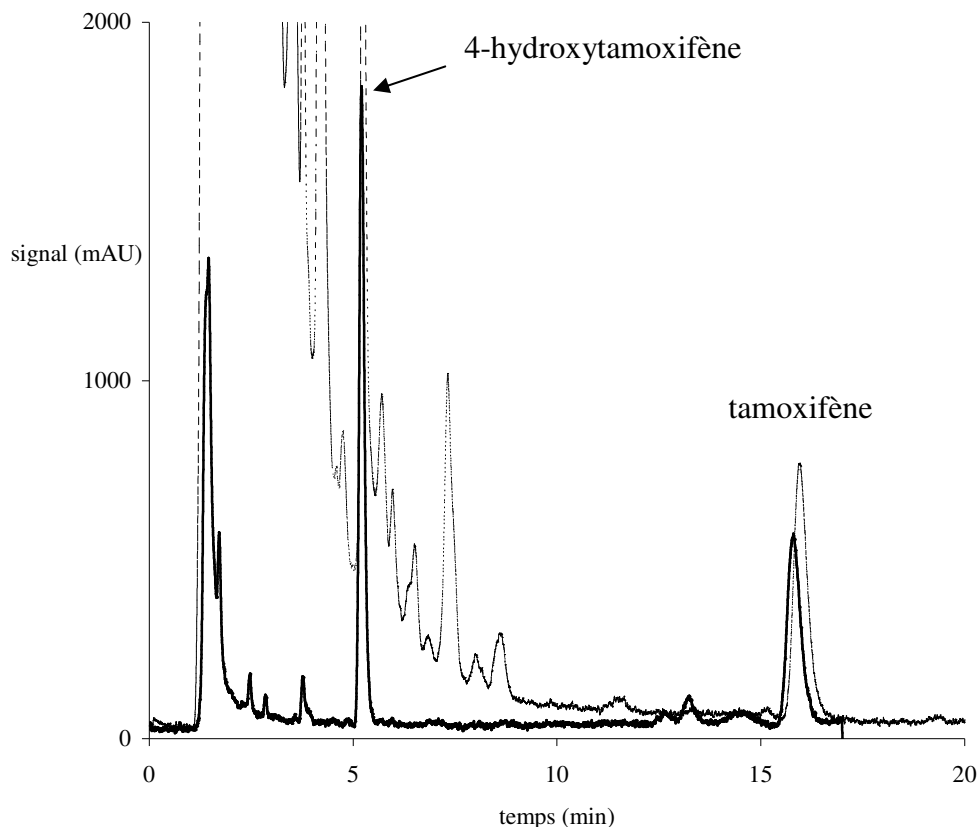


Figure III.18: Comparaison de deux modes de prétraitement d'un échantillon d'urine hydrolysée, dopée au tamoxifène (0,125 µg/mL) et au 4-hydroxytamoxifène (0,125 µg/mL): SPE-HLB (trait en pointillés), SPE-HLB-MIP A (trait plein), **PROTOCOLE 2**. Analyse par CPL – UV (240 nm), annexe XI.

Les performances des deux protocoles 1 et 2 sont comparées à partir des rendements d'extraction de la SPE combinée HLB-MIP A. Ces valeurs sont le produit des recouvrements obtenus à chacune des étapes d'élution, HLB et MIP A. Les deux démarches sont rappelées succinctement:

PROTOCOLE 1 ☞ dépôt direct d'urine hydrolysée, diluée dans le tampon NH_2OH -AcOH (pH 7, I = 50 mM) sur le MIP A,

PROTOCOLE 2 ☞ dépôt d'urine hydrolysée, diluée dans l'eau, sur une cartouche HLB, puis dépôt de l'extrait élué sur le MIP A.

Les rendements en tamoxifène et en 4-hydroxytamoxifène obtenus sont reportés dans le tableau III.17.

	PROTOCOLE 1	PROTOCOLE 2
Rendement du tamoxifène (%)	14	56 ($0,56 = 0,81 \text{ (HLB)} \times 0,70 \text{ (MIP A)}$)
Rendement du 4-hydroxytamoxifène (%)	57	62 ($0,62 = 0,83 \text{ (HLB)} \times 0,75 \text{ (MIP A)}$)

Tableau III.17: Rendements d'extraction obtenus pour le tamoxifène et le 4-hydroxytamoxifène dans une urine hydrolysée selon les **PROTOCOLES 1** et **2**.

Le **PROTOCOLE 2** apporte un rendement d'extraction nettement supérieur pour le tamoxifène et équivalent pour le 4-hydroxytamoxifène à celui obtenu pour chacun de ces composés dans le **PROTOCOLE 1**. Toutefois, la procédure reste à optimiser afin d'atteindre des recouvrements plus élevés à l'étape d'élution du MIP A.

III.3.3. Etude d'un MIP mixte à deux monomères fonctionnels MAA – styrène (MIP B)

L'augmentation des rendements d'extraction du tamoxifène et de son métabolite par SPE sur MIP revient à s'assurer de la rétention de ces deux composés jusqu'à l'étape d'élution. Un moyen d'atteindre cet objectif est de diminuer le nombre d'étapes de lavage, au risque de ne pas rompre la totalité des interactions non spécifiques et, par conséquent, de n'éliminer que partiellement la matrice.

Une nouvelle synthèse de polymère a été réalisée avec un mélange de styrène et d'acide méthacrylique comme monomères fonctionnels. On fait l'hypothèse qu'il se crée des interactions hydrophobes et de type π - π (ou stacking) entre les groupements phényles du tamoxifène et du styrène, simultanément aux liaisons hydrogène et aux interactions ioniques formées entre le tamoxifène et l'acide méthacrylique. Dans ce cas, l'intégralité de la structure de la molécule de tamoxifène est prise en compte au cours de sa recapture par l'empreinte.

De plus, le nombre de résidus MAA dans le polymère décroît, et les interactions non spécifiques devraient diminuer comme les résultats obtenus avec les isothermes de Freundlich (§ III.2.2.c-4) l'ont déjà montré.

La spécificité de reconnaissance du MIP B (styrène-MAA) vis-à-vis des molécules recherchées, au cours du protocole SPE, est étudiée dans les paragraphes suivants.

III.3.3.1. Identification des conditions expérimentales d'utilisation du MIP styrène-MAA (MIP B)

a) Synthèse du MIP B

Le MIP B a été préparé selon un processus non covalent et par voie thermique (Annexe IV). La nature et les quantités de molécule empreinte (clomiphène), monomères fonctionnels (MAA et styrène) et agent réticulant (EDMA) sont reportées dans le tableau III.18.

Réactif	Quantité (mmole)	$n_{\text{réactif}} / n_{\text{clomiphène}}$
clomiphène	0,085	1
MAA	0,34	4
styrène	0,34	4
EDMA	3,4	40

Tableau III.18: Quantités des réactifs introduits dans le mélange de prépolymérisation lors de la synthèse du MIP B.

La molécule empreinte est le clomiphène, obtenu par dissolution du citrate de clomiphène dans une solution basique suivie d'une extraction liquide-liquide au chloroforme. Le clomiphène, sous forme neutre, est récupéré par évaporation du chloroforme. La neutralisation de la fonction amine du clomiphène permet d'intensifier les interactions molécule empreinte - MAA.

La quantité de MAA utilisée tient compte du nombre (3) de groupes fonctionnels de la molécule de clomiphène capables d'interagir par liaisons hydrogène. Un équivalent supplémentaire est ajouté de façon à déplacer l'équilibre de complexation.

La quantité de styrène est choisie selon les mêmes critères. Sachant que la molécule de clomiphène contient trois noyaux benzéniques, la synthèse du MIP est réalisée avec un ratio molaire styrène/clomiphène égal à quatre.

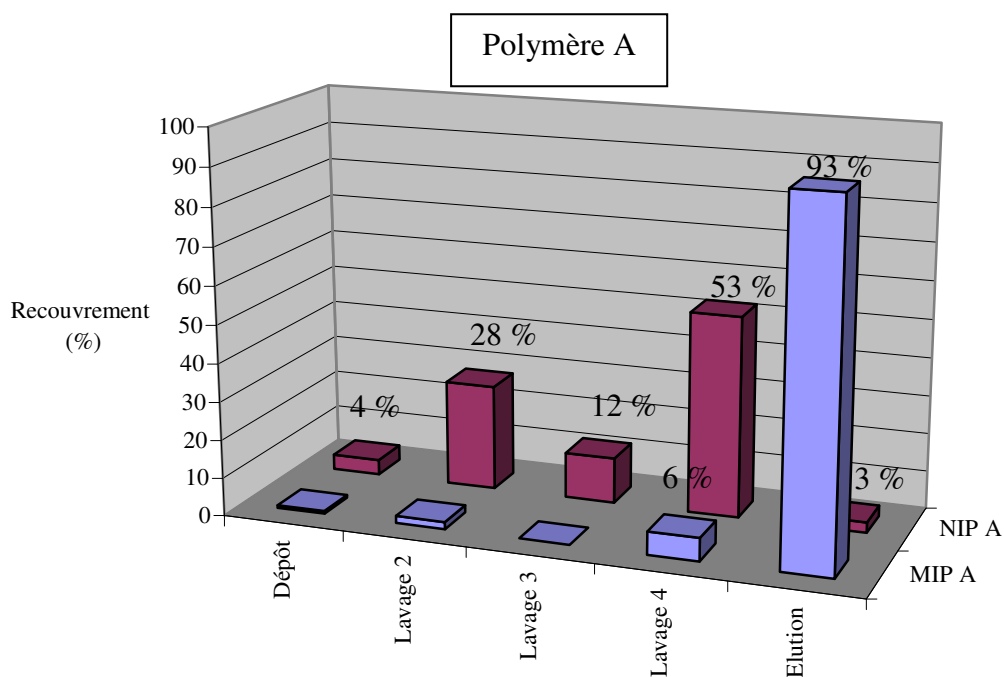
L'acétonitrile est gardé comme solvant porogène, le volume introduit dans le mélange de prépolymérisation est identique à celui du protocole de synthèse du MIP A. Ces conditions doivent reproduire un matériau de porosité équivalente à celle du polymère A.

b) Comparaison des polymères A et B au cours du PROTOCOLE 2

Les sélectivités des MIPs A et B sont comparées à partir des recouvrements obtenus au cours des différentes étapes de lavage. L'échantillon est une solution urinaire artificielle constituée de sels (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} et Cl^-), d'urée et de créatinine aux concentrations mentionnées dans

l'annexe XIII. Cette solution subit une hydrolyse enzymatique, identique à celle appliquée à une matrice réelle, avant d'être dopée au tamoxifène et au 4-hydroxytamoxifène. Puis, le protocole de SPE combinée HLB-MIP est réalisé sur les polymères A et B.

Les histogrammes de la figure III.19 reportent les recouvrements obtenus pour le 4-hydroxytamoxifène à chaque étape du PROTOCOLE 2.



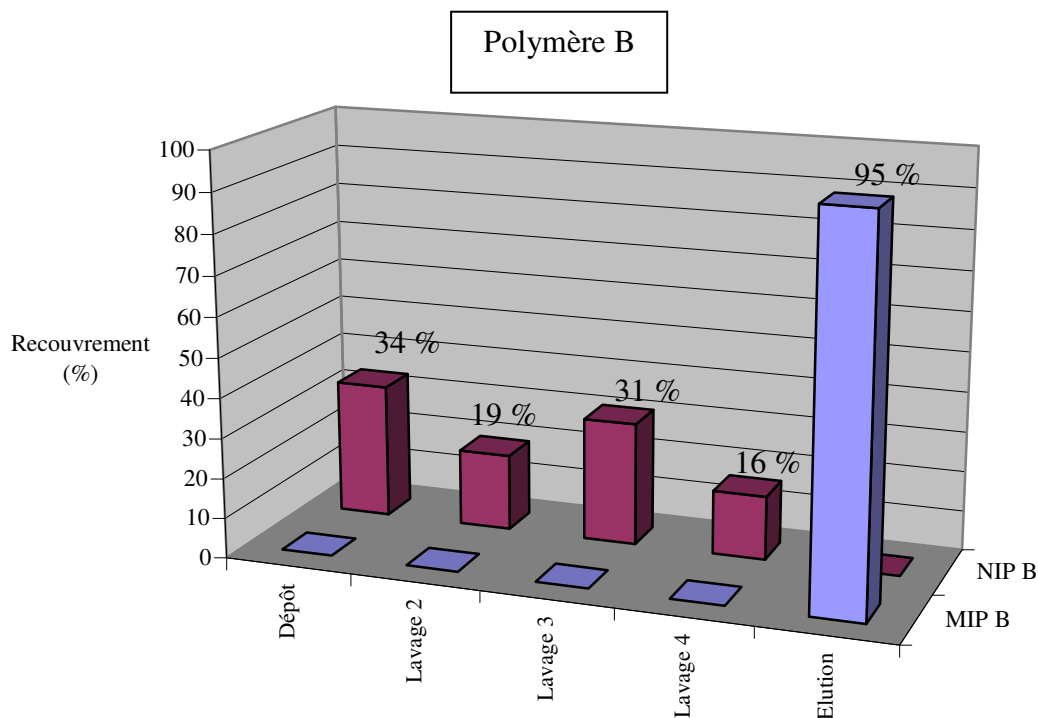


Figure III.19: Recouvrements obtenus pour la seconde étape du **PROTOCOLE 2** appliquée aux MIP et NIP A et B. Echantillon: urine artificielle dopée au 4-hydroxytamoxifène et au tamoxifène (résultats non montrés pour le tamoxifène).

Les recouvrements du 4-hydroxytamoxifène lors des étapes d'élution sont excellents (93 et 95 %) sur les deux MIPs. Les mêmes recouvrements sont retrouvés pour le tamoxifène (résultats non montrés).

La sélectivité du MIP par rapport au NIP est révélée :

- par des mélanges polaires et protiques (lavages 2 et 4, respectivement MeOH / H₂O 50/50 (v/v) et ACN / AcOH 99,8/0,2 (v/v)) pour le polymère A,
- par l'acétonitrile (dépôt et lavage 3) pour le polymère B.

Ces résultats sont favorables à la mise en place d'un protocole simplifié d'extraction du tamoxifène et de son métabolite sur le MIP B, avec une étape de lavage sélectif à l'acétonitrile.

III.3.3.2. Réalisation d'une SPE seule sur MIP B

Une SPE avec un dépôt direct de l'urine sur le MIP B a été réalisée afin d'éliminer l'étape d'extraction sur cartouche HLB, et de simplifier le protocole de préparation d'échantillon. Une procédure SPE (**PROTOCOLE 3**) comprenant deux étapes de lavage a été mise au point (**Tableau III.19**).

Etape	Composition du mélange	Volume (mL)
Conditionnement	1) ACN	4
	2) MeOH	4
	3) H ₂ O	4
Dépôt	tamoxifène (0,25 µg/mL) et 4-hydroxytamoxifène (0,08 µg/mL) dans urine hydrolysée	7
Lavage 1	H ₂ O → tampon AcOH-NH ₂ OH (pH 7, I = 20 mM) / MeOH 95 / 5 (v/v)	6
Lavage 2	MeOH / H₂O 50/50 (v/v)	0
Lavage 3	ACN	4
Lavage 4	ACN / AcOH 99,5/0,5 (v/v)	0
Elution	MeOH / AcOH 99/1 (v/v)	4

Tableau III.19: Protocole SPE appliqué au MIP B et au NIP B à partir d'urine hydrolysée et dopée au tamoxifène (0,25 µg/mL) et au 4-hydroxytamoxifène (0,08 µg/mL) (**PROTOCOLE 3**).

L'urine hydrolysée est dopée en 4-hydroxytamoxifène à la concentration maximale (0,08 µg/mL) relevée dans l'urine 24 heures après la prise de tamoxifène [8]. L'échantillon est déposé sans dilution préalable sauf si sa viscosité ne le permet pas.

L'étape de lavage 1, solution majoritairement aqueuse, permet par une force ionique de 20 mM de déplacer les cations (Na⁺, K⁺ et Ca²⁺) susceptibles d'interagir avec l'acide méthacrylique. Les molécules organiques à caractère fortement polaire sont éliminées par 5 % MeOH. La rétention du tamoxifène et du 4-hydroxytamoxifène est assurée par des liaisons hydrophobes et ioniques.

Conformément aux conclusions apportées dans le § III.3.3.1, les étapes de lavages protiques (2 et 4) ont été supprimées.

L'étape de lavage 3 (ACN) élimine les molécules endogènes tout en retenant sélectivement le tamoxifène et le 4-hydroxytamoxifène sur le MIP.

A l'étape d'élution, un faible pourcentage d'acide acétique (1 %) évite l'élimination des molécules de la matrice urinaire fortement retenues par interactions non spécifiques. La fraction récupérée à l'élution est évaporée à sec et redissoute dans 875 μL de phase mobile pour être analysée par CPL-UV (240 nm).

La résolution du pic du 4-hydroxytamoxifène avec le pic de la matrice est satisfaisante. La figure III.20 reporte le chromatogramme obtenu après SPE de l'urine hydrolysée.

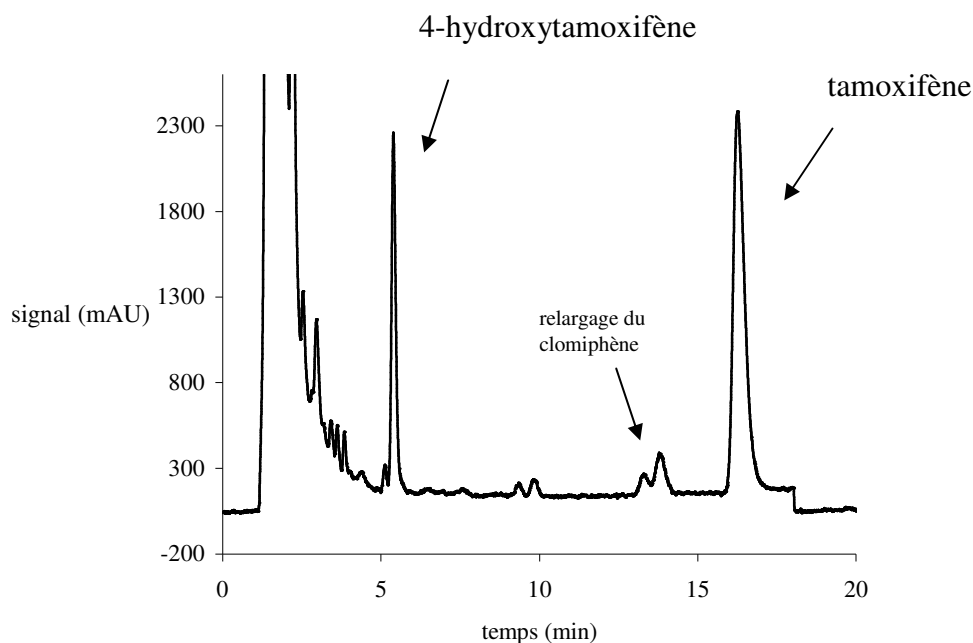


Figure III.20: Chromatogramme obtenu après élution du MIP B à partir d'un échantillon d'urine hydrolysée dopée au tamoxifène (0,25 $\mu\text{g/mL}$) et au 4-hydroxytamoxifène (0,08 $\mu\text{g/mL}$), **PROTOCOLE 3**. Analyse par chromatographie liquide – UV (240 nm), annexe XI.

Les histogrammes de la figure III. 21 indiquent les recouvrements à l'élution. Les valeurs obtenues sont satisfaisantes puisque les recouvrements du tamoxifène et de son métabolite sont respectivement de 88 et 86 % sur le MIP B. Le nombre restreint de lavages, deux au lieu des quatre mis en œuvre lors du dépôt direct de l'urine sur le MIP A, évite l'élution précoce des solutés.

Les recouvrements à l'élution du NIP B sont toujours inférieurs à ceux du MIP B, grâce à l'élimination d'une part importante des interactions non spécifiques au cours des lavages. La sélectivité du MIP B par rapport au NIP B est donc vérifiée dans les deux cas.

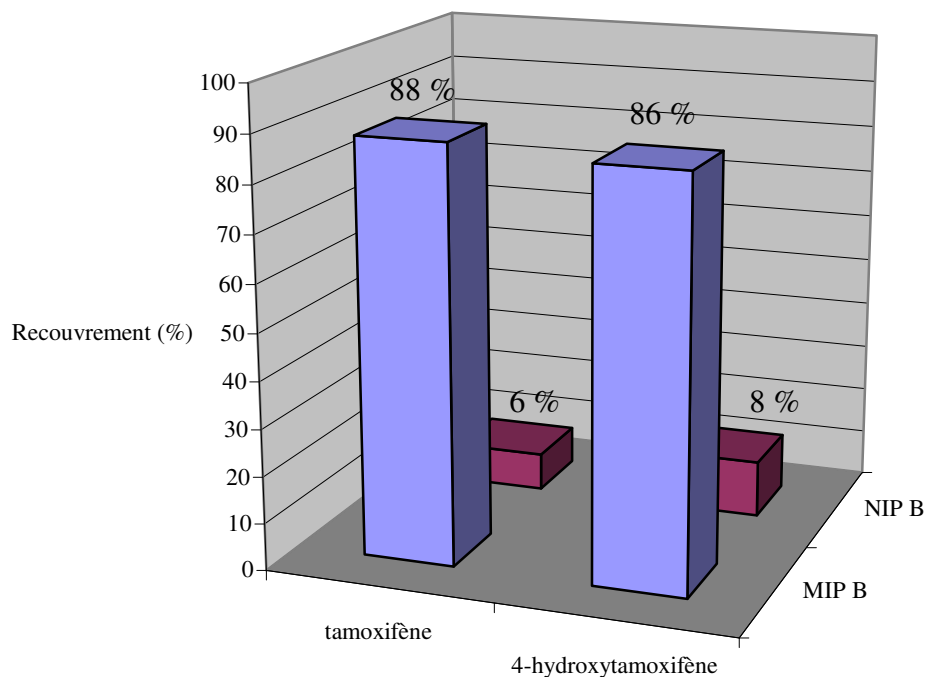


Figure III. 21: Recouvrements obtenus à l'élution du MIP B et du NIP B (**PROTOCOLE 3**) avec dépôt d'une urine hydrolysée et dopée au tamoxifène (0,25 µg/mL) et au 4-hydroxytamoxifène (0,08 µg/mL).

En conclusion, un protocole simplifié à deux étapes de lavage et avec dépôt direct de l'urine sur le MIP, apporte des recouvrements en tamoxifène et 4-hydroxytamoxifène satisfaisants (compris entre 80 et 90 %) avec un facteur de concentration de 8.

Le rendement d'extraction du tamoxifène par le MIP A ayant été nettement amélioré grâce au protocole combiné SPE-HLB-MIP A (**PROTOCOLE 2**), une démarche similaire est mise en place avec le MIP B.

III.3.3.3. Réalisation de deux SPE successives sur HLB et MIP B

Un nouveau protocole de SPE combinée, nommé **PROTOCOLE 4**, est mis en place à partir du MIP B. La première étape, réalisée sur la cartouche HLB (1mL, 30 mg), est reportée dans le tableau III.20:

Etape	Composition	Volume (mL)
Conditionnement	1) ACN	4
	2) MeOH	4
	3) H ₂ O	4

Dépôt	tamoxifène (0,25 µg/mL) et 4-hydroxytamoxifène (0,08 µg/mL) dans urine hydrolysée	8
Lavage	H ₂ O → tampon AcOH – NH ₃ (pH 10, I = 5 mM) / MeOH 95/5 (v/v)	6
Elution	ACN	4

Tableau III.20 : Protocole SPE sur une cartouche HLB (1 mL, 30 mg) appliqué à de l'urine hydrolysée et dopée au tamoxifène et au 4-hydroxytamoxifène. Première étape du **PROTOCOLE 4**.

L'étape de lavage sur HLB a été modifiée par rapport à la première étape du PROTOCOLE 2:

☞ par l'ajout de MeOH (5 %) afin de favoriser l'élimination des molécules organiques très polaires,

☞ par un tampon (pH 10) afin de s'assurer la rétention totale par liaisons hydrophobes du tamoxifène et du 4-hydroxytamoxifène neutralisés.

L'étape d'éluion réalisée avec l'acétonitrile est quantitative avec un recouvrement de 98 % pour le tamoxifène (le pic du 4-hydroxytamoxifène étant caché par le massif de la matrice urinaire extraite, aucun recouvrement n'a été calculé).

L'éluat est directement déposé sur deux cartouches SPE (volume 1 mL), respectivement remplies de MIP B et NIP B (60 mg).

Le protocole d'extraction du tamoxifène et du 4-hydroxytamoxifène par SPE sur les MIP et NIP B est reporté dans le tableau III.21.

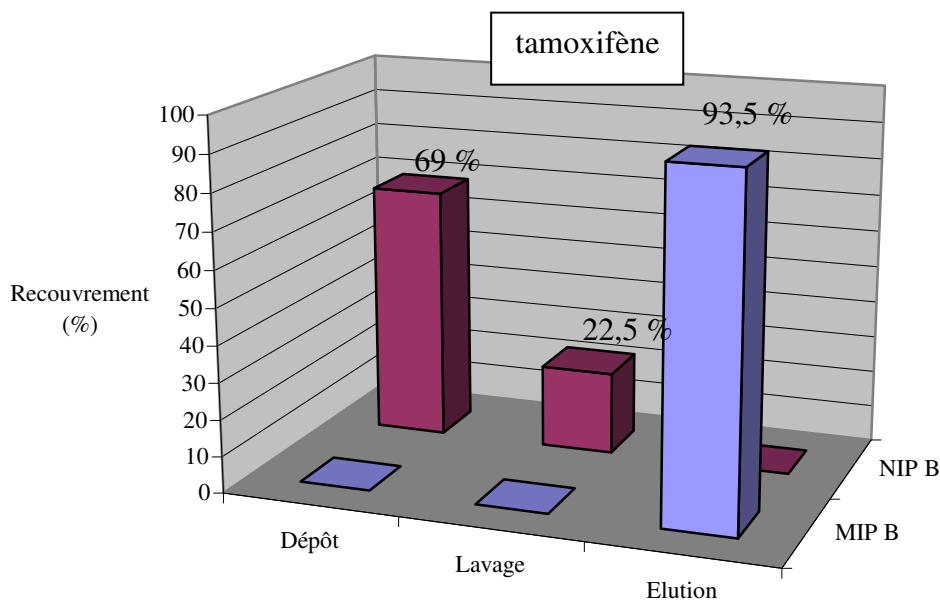
Etape	Composition du mélange	Volume (mL)
Conditionnement	1) MeOH	4
	2) ACN	4
Dépôt	Elution HLB: tamoxifène (0,5 µg/mL) et 4-hydroxytamoxifène (0,16 µg/mL) dans ACN	4
Lavage 1	H₂O	0
Lavage 2	MeOH / H₂O 50/50 (v/v)	0
Lavage 3	ACN → ACN / MeOH 95/5 (v/v)	4
Lavage 4	ACN / AcOH 99,5/0,5 (v/v)	0
Elution	MeOH / AcOH 90/10 (v/v)	4

Tableau III.21: Protocole SPE sur le MIP B et le NIP B appliqué à la fraction éluée lors de la SPE-HLB. Seconde étape du **PROTOCOLE 4**.

Les étapes de lavages 1, 2 et 4 ont été supprimées et l'étape de lavage 3 a été légèrement modifiée.

La fraction récupérée à l'étape d'éluion est évaporée à sec et redissoute dans 1 mL de phase mobile puis analysée par CPL-UV (240 nm).

Comme le montrent les histogrammes de la figure III.22, l'acétonitrile utilisé comme solvant de dépôt et de lavage favorise la rétention sélective du tamoxifène et du 4-hydroxytamoxifène dans les empreintes du MIP. L'ajout de 5 % de MeOH à l'étape de lavage 3 facilite l'élimination de la matrice polaire.



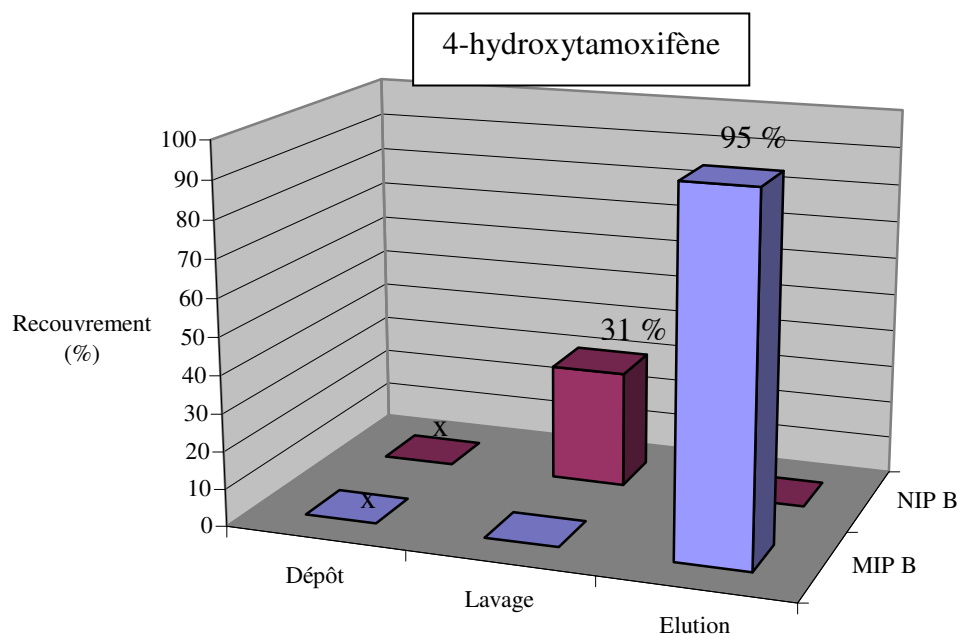


Figure III.22: Recouvrements obtenus pour la seconde étape du **PROTOCOLE 4** appliqué à de l'urine hydrolysée et dopée. (x: recouvrement non calculé car pic non identifié).

Pour le tamoxifène, le rendement expérimental est de 91,6 % (98 % sur HLB et 93,5 % sur le MIP B) et pour le 4-hydroxytamoxifène, le rendement expérimental est de 93 % (calculé à partir d'une solution étalon externe de 4-hydroxytamoxifène (0,64 µg/mL)) avec un facteur de concentration de 8.

- Comparaison des PROTOCOLES 2 et 4 :

Le rendement d'extraction de ces deux composés sur HLB est supérieur dans le PROTOCOLE 4 par rapport au PROTOCOLE 2, sans doute en raison de la modification du pH de la solution de lavage (meilleure rétention du tamoxifène neutre) et de la nature du solvant d'élution (ACN au lieu de MeOH).

Le PROTOCOLE 4 appliqué au MIP B permet d'obtenir un rendement en tamoxifène (91,6 %) supérieur à celui obtenu avec le PROTOCOLE 2 appliqué au MIP A (56 %). Il en est de même pour le 4-hydroxytamoxifène (93 % au lieu de 62 %).

- Comparaison des PROTOCOLES 3 et 4 :

Le PROTOCOLE 4 apporte des rendements d'extraction légèrement supérieurs pour le tamoxifène et le 4-hydroxytamoxifène à ceux du PROTOCOLE 3.

L'analyse d'une urine hydrolysée non dopée soumise au **PROTOCOLE 4** confirme l'absence d'interférences endogènes aux temps de rétention du tamoxifène et du 4-hydroxytamoxifène. D'autre part, l'analyse par CPL – UV (240 nm) prouve l'élimination d'une partie importante de la matrice polaire par l'étape SPE sur MIP B (**Figure III.23**).

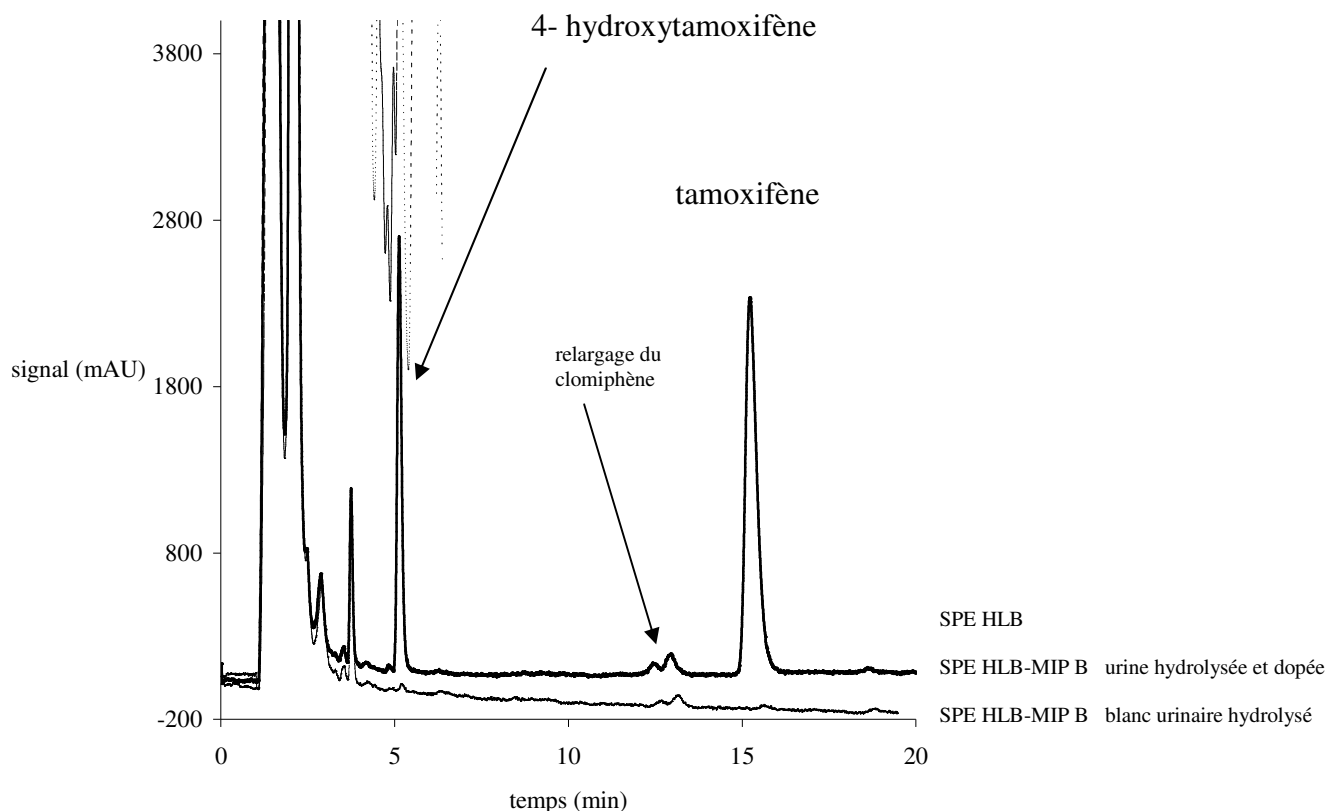


Figure III.23: Comparaison de deux modes de prétraitement d'un échantillon d'urine hydrolysée, dopée au tamoxifène (0,25 µg/mL) et au 4-hydroxytamoxifène (0,08 µg/mL): SPE-HLB (trait en pointillés), SPE-HLB-MIP B (trait plein), **PROTOCOLE 4**. Analyse par CPL – UV (240 nm), annexe XI.

III.3.4. Conclusion

Les résultats obtenus avec le MIP A (monomère fonctionnel MAA, **PROTOCOLE 1**) ont apporté des rendements faible pour le tamoxifène (14 %) et modéré pour le 4-hydroxytamoxifène (56 %), sans doute dus à une élimination incomplète de la matrice urinaire lors des étapes de lavage (les constituants polaires de la matrice sont retenus par des liaisons hydrogène et ioniques échangées avec les groupes fonctionnels MAA).

La mise au point de deux SPE successives (**PROTOCOLE 2**), la première sur cartouche polymérique HLB et la seconde sur le MIP A, a permis d'éliminer davantage de matrice

urinaire et d'assurer des rendements de 56 % pour le tamoxifène et de 62 % pour le 4-hydroxytamoxifène.

Un second polymère à empreintes moléculaires a été synthétisé à partir de deux monomères fonctionnels MAA 50 % et styrène 50 %. Un protocole simplifié à deux étapes de lavage (**PROTOCOLE 3**) a permis d'obtenir des rendements satisfaisants de 88 et 86 % pour le tamoxifène et le 4-hydroxytamoxifène.

Le système combiné HLB-MIP B a amélioré les rendements (91,6 % pour le 4-hydroxytamoxifène et 93 % pour le tamoxifène, **PROTOCOLE 4**) avec une seule étape de lavage pour chaque SPE. De plus, l'élimination de la matrice urinaire est meilleure qu'avec le polymère B seul.

Ce travail initié sur le MIP MAA avec un protocole SPE à quatre étapes de lavage permet de proposer un protocole simple (deux étapes de lavage) et quantitatif (rendements supérieurs à 90 %) avec le MIP MAA-styrène. Le caractère hydrophobe renforcé de ce MIP mixte (MAA-styrène) permet une meilleure élimination de la matrice urinaire.

Une étude de répétabilité doit précéder la validation des protocoles établis sur des urines de patients soumis à la prise régulière de tamoxifène. Cette ultime étape devrait compléter les performances des quatre protocoles mis en place sur les MIPs A et B.

PROTOCOLE 1 SPE seule sur le MIP A 4 lavages
Tableau III.13

Étape	Composition du mélange
Conditionnement	1) MeOH 2) ACN 3) tampon NH ₂ OH-AcOH (pH 7, I = 10 mM)
Dépôt	tamoxifène (0,5 µg/mL) dissous dans tampon NH ₂ OH-AcOH (pH 7, I = 10 mM)
Lavage 1	H ₂ O
Lavage 2	MeOH / H ₂ O 50/50 (v/v)
Lavage 3	ACN
Lavage 4	ACN / AcOH 99,5/0,5 (v/v)
Elution	MeOH / AcOH 90/10 (v/v)

PROTOCOLE 2 SPE combinée HLB-MIP A 1 lavage (HLB) + 3 lavages (MIP A)
Tableaux III.14 et III.16

1) HLB

Étape	Composition
Conditionnement	1) MeOH 2) H ₂ O
Dépôt	tamoxifène (0,125 µg/mL) et 4-hydroxytamoxifène (0,125 µg/mL) dans l'urine hydrolysée diluée 1/1 (v/v) dans H ₂ O
Lavage	H ₂ O
Elution	MeOH (évaporation à sec et redissolution dans ACN)

2) MIP A

Étape	Composition du mélange
Conditionnement	1) MeOH 2) ACN
Dépôt	Elution HLB: tamoxifène (0,4 µg/mL) et 4-hydroxytamoxifène (0,4 µg/mL) dans ACN
Lavage 1	H₂O (pH 6)
Lavage 2	MeOH / H₂O 50/50 (v/v)
Lavage 3	ACN
Lavage 4	ACN / AcOH 99,8/0,2 (v/v)
Elution	MeOH / AcOH 90/10 (v/v)

PROTOCOLE 3 MIP B 2 lavages
Tableau III.19

Etape	Composition du mélange
Conditionnement	1) ACN 2) MeOH 3) H ₂ O
Dépôt	tamoxifène (0,25 µg/mL) et 4-hydroxytamoxifène (0,08 µg/mL) dans urine hydrolysée
Lavage 1	H ₂ O → tampon AcOH-NH ₂ OH (pH 7, I = 20 mM) / MeOH 95 / 5 (v/v)
Lavage 2	MeOH / H₂O 50/50 (v/v)
Lavage 3	ACN
Lavage 4	ACN / AcOH 99,5/0,5 (v/v)
Elution	MeOH / AcOH 99/1 (v/v)

PROTOCOLE 4 SPE combinée HLB-MIP B 1 lavage (HLB) + 1 lavage (MIP B)
Tableaux III.20 et III.21

1) HLB

Etape	Composition
Conditionnement	1) ACN 2) MeOH 3) H ₂ O
Dépôt	tamoxifène (0,25 µg/mL) et 4-hydroxytamoxifène (0,08 µg/mL) dans urine hydrolysée
Lavage	H ₂ O → tampon AcOH – NH ₃ (pH 10, I = 5 mM) / MeOH 95/5 (v/v)
Elution	ACN

2) MIP B

Etape	Composition du mélange
Conditionnement	1) MeOH 2) ACN
Dépôt	Elution HLB: tamoxifène (0,5 µg/mL) et 4-hydroxytamoxifène (0,16 µg/mL) dans ACN
Lavage 1	H₂O
Lavage 2	MeOH / H₂O 50-50 (v/v)
Lavage 3	ACN → ACN / MeOH 95-5 (v/v)
Lavage 4	ACN / AcOH 99,5/0,5 (v/v)
Elution	MeOH / AcOH 90/10 (v/v)

Références bibliographiques

- [1] R.K.Müller, J.Grosse, D.Thieme, R.Lang, J.Teske, H.Trauer. *J.Chromatogr.A* 843 (1999) 275.
- [2] A.T.Cawley, E.R.Hine, G.J.Trout, A.V.George, R.Kazlawskas. *Forensic Science International* 143 (2004) 103.
- [3] C.Saudan, M.Kamber, G.Barbati, N.Robinson, A.Desmarchelier, P.Maugin, M.Sauzi. *J.Chromatogr.B* 831 (2006) 324.
- [4] K.Deventer, P.Van Eenoo, P.Mikulcikova, W.Van Thuyne, F.T. Delbeke. *J.Chromatogr.B* 828 (2005) 21.
- [5] E.Lyris, G.Tsiakatouras, Y.Angelis, M.Koupparis, M.H.Spyridaki, C.Georgakopoulos. *J.Chromatogr.B* 827 (2005) 199.
- [6] Y.Lung Tseng, M-H.Shieh, F-H.Kuo. *Forensic Science International* 157 (2006) 149.
- [7] Report on Carcinogens, *Eleventh Edition* (2004).
- [8] R.Mihailescu, H.Y. Aboul-Enein, M.D. Efstatide. *Biomed. Chromatogr.* 14 (2000) 180.
- [9] U.Mareck-Engelke, G.Sigmund, G.Opfermann, H.Geyer, W.Schäuzer. *Recent Advances in Doping Analysis* 9 (2001) 53.
- [10] R.E. Favoni, A.de Cupis. *Trends Pharm. Sci.* 19 (1998) 406.
- [11] J. Große, R. Lang, R.K. Mueller, D. Thieme. *Recent advances in doping analysis (2) Sport und Buch Strauß, Köln.* (1995) 317.
- [12] L.R.Snyder, J.J.Kirkland, J.L.Glajch. *Practical HPLC Method Development, Second Edition, Wiley-Interscience Publication* (1997).
- [13] S.Y.Kim, N.Suzuki, Y.R.S. Laxmi, R.Rieger, S.Shibutani. *Chem.Res.Toxicol.* 16 (2003) 1138.
- [14] J.MacCallum et al. *J.Chromatogr.B* 678 (1996) 317.
- [15] R.S.Plumb, H.Warwick, D.Higton, G.J.Dear, D.N.Mallett. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 15 (2001) 297.
- [16] M.Sharma. *Biochem.Biophys. Res. Commun.* 273 (2000) 40.
- [17] K.H.Lee, B.A.Ward, Z.Desta, D.A.Flockart, D.R.Jones. *J.Chromatogr.B* 791(2003) 245.
- [18] J.E.Manns, S.Hanks, J.E.Brown. *J.Pharm.Biomed.Anal.* 16 (1998) 847.
- [19] J.Gjerde, E.R.Kisanga, M.Hauglid, P.I.Holm, G.Mellgren, E.A.Lien. *J.Chromatogr.A* 1082 (2005) 6.
- [20] C.K.Lim, Z.X.Yuan, R.M.Jones, I.N.H.White, L.L.Smith. *J.Pharm.Biomed.Anal.* 15 (1997) 1335.

- [21] M.I.Churchwell, N.C.Twaddle, L.R.Meeker, D.R.Doerge. *J.Chromatogr.B* 825 (2005) 134.
- [22] H.Zeng, Y.Deng, J-J.Wu. *J.Chromatogr.B.* 788 (2003) 331.
- [23] X-F.Li, S.Carter, N.J.Dovichi, J.Y.Zhao, P.Kovarik, T.Sakuma. *J.Chromatogr.A* 914 (2001) 5.
- [24] J.Girault, B.Istin, J.B. Fourtillan. *Biol.Mass Spectron.* 22 (1993) 395.
- [25] J.M.Sanders, L.T.Burka, M.D.Shelby, R.R.Newbold, M.L.Cunningham. *J.Chromatogr.B.* 695 (1997) 181.
- [26] J.Rodriguez Flores, J.J.Berzas Nevado, A.M.Contento Salado, M.P.Cabello Diaz. *Talanta* 65 (2005) 155.
- [27] X-F.Li, S.J.Carter, N.J.Dovichi. *J.Chromatogr.A.* 895 (2000) 81.
- [28] B.A. Rashid, R.J. Briggs, J.N. Hay, D. Stevenson. *Anal. Commun.* 34 (1997) 303.
- [29] F. Nie, J. Lu, Y. He, J. Du. *Luminescence* 20 (2005) 315.
- [30] P.D.Martin, T.D.Wilson, I.D.Wilson and G.R.Jones. *Analyst* 126 (2001) 757.
- [31] Q.Z.Zhu, K.Haupt, D.Knopp, R.Niesser. *Anal. Chim. Acta* 468 (2002) 217.
- [32] R.Sips. *J.Chem.Phys.*16 (1948) 490.
- [33] R.Sips. *J.Chem.Phys.*18 (1950) 1024.
- [34] P.Sajonz, M.Kele, G.M.Zhong, B.Sellergren, G.Guiochon. *J.Chromatogr.A* 964 (2002) 99.
- [35] R.J.Umpleby II, S.C.Baxter, A.M.Rampey, G.T.Rushton, Y.Chen, K.D.Shimizu. *J.Chromatogr.B* 804 (2004) 141.
- [36] R.J.Umpleby II, S.C.Baxter, M.Bode, J.K.Berch Jr., R.N.Shah, K.D.Shimizu. *Anal. Chim. Acta* 435 (2001) 35.
- [37] A.M.Rampey, R.J.Umpleby II, G.T.Rushton, J.C.Iseman, R.N.Shah, K.D.Shimizu. *Anal.Chem.* 76 (2004) 1123.
- [38] G. P. Gonzalez, P. F. Hernando, J.S. Durand Alegria. *Anal. Chim. Acta* 557 (2006) 179.
- [39] D.A.Spivak. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57 (2005) 1779.
- [40] B.Sellergren, K.J.Shea. *J.Chromatogr.* 635 (1993) 31.
- [41] P.A.G.Cormack, A.Z.Elorza. *J.Chromatogr.B* 804 (2004) 173.
- [42] H.Kempe, M.Kempe. *Anal.Chem.* 78 (2006) 3659.
- [43] E.Caro, R.M.Marcé, P.A.G. Cormack, D.C.Sherrington, F.Borrull. *Anal. Chim. Acta* 562 (2006) 145.
- [44] K.Möller, U.Nilsson, C.Crescenzi. *J.Chromatogr.B* 811 (2004) 171.

- [45] J.H.Zhang, M.Jiang, L.Zou, D.Shi, S-R.Mei, Ye-X.Zhu, Y.Shi, K.Dai, B.Lu. *Anal. Bioanal.Chem.* 385 (2006) 780.
- [46] W.M.Mullett, M.Walles, K. Levsen, J.Borlak, J.Pawliszyn. *J.Chromatogr.B* 801 (2004) 297.
- [47] M.Fiori, C.Civitareale, S.Mirante, E.Magard, G.Brambilla. *Anal. Chim. Acta* 529 (2005) 207.
- [48] F.Chapuis, V.Pichon, F.Lanza, S.Sellergren, M-C.Hennion. *J.Chromatogr.A* 999 (2003) 23.
- [49] S.Weigel, R.Kallenborn, H.Hühnerfuss. *J.Chromatogr.A* 1023 (2004) 183.
- [50] S.Le Moullec, L.Truong, C.Montauban, A.Begos, V.Pichon, B.Bellier. *J.Chromatogr.A* 1139 (2007) 171.

CONCLUSION GENERALE

L'analyse chromatographique d'un échantillon complexe nécessite une étape préalable de prétraitement de l'échantillon de façon à éliminer le maximum de matrice, cette dernière pouvant être la cause d'une altération de la séparation ou de suppression ionique lors du couplage à la spectrométrie de masse. La préconcentration en molécules ciblées permet en outre d'améliorer la sensibilité de la méthode analytique choisie. A cette fin, l'extraction solide-liquide sur des supports classiques à base de silice ou de polymère est très largement utilisée. Toutefois, les résultats expérimentaux obtenus dans le chapitre II ont montré l'absence de sélectivité des interactions de types hydrophobes et/ou ioniques pour l'extraction de molécules de polarité similaire et de charges identiques. Il s'est avéré que l'utilisation en série de deux SPE silice C₁₈ et SAX n'a pas réussi à séparer les acides triterpéniques des acides gras, molécules endogènes présentes dans un extrait végétal.

Au cours des travaux présentés dans ce manuscrit, un support polymère à empreintes moléculaires (MIP) a été préparé et testé afin de tendre vers une meilleure sélectivité d'extraction. Un protocole simple de polymérisation par voie thermique a été mis en jeu avec un agent réticulant, l'EDMA, et un ou deux monomères fonctionnels (MAA et /ou styrène) selon l'application du MIP.

Quelques précautions méthodologiques ont été prises :

- La synthèse de l'un des MIPs a été réalisée à partir d'un analogue de la molécule ciblée afin d'éviter tout problème d'interférence dû au relargage (bleeding) de la molécule empreinte lors du protocole SPE.
- Les solvants porogènes de synthèse ont été choisis de manière à assurer non seulement l'homogénéité du mélange réactionnel mais aussi des interactions non covalentes fortes (liaisons hydrogène et/ou interactions ioniques) entre le(s) monomère(s) et la molécule empreinte.

A l'issue de la synthèse du MIP, deux voies de caractérisation du matériau obtenu ont été suivies. La première a consisté à tracer des isothermes d'adsorption afin de mettre en évidence la présence d'empreintes dans le MIP. La seconde, basée sur des expériences de recapture, renseigne sur la nature des solutions capables d'assurer la rétention sélective de la molécule ciblée par les empreintes du MIP. Ces mêmes expériences sont réalisées sur le NIP, polymère non imprimé, préparé dans des conditions identiques à celles du MIP, excepté la molécule empreinte absente du mélange réactionnel dans le cas du NIP.

- Le traitement mathématique des courbes d'adsorption selon le modèle de Freundlich a permis de caractériser l'hétérogénéité du MIP et du NIP et d'estimer le nombre apparent de sites en fonction de l'affinité de ces derniers pour la molécule ciblée. L'hétérogénéité en forme et en énergie des sites d'adsorption limite la capacité et la spécificité du MIP vis-à-vis de la molécule ciblée (et de ses analogues).

- L'étude de la recapture de la molécule ciblée identifie les solutions capables d'éliminer les interactions non spécifiques. Ces dernières sont supposées négligeables lorsque la rétention de l'analyte sur le NIP est nulle. Dans le cas du tamoxifène, la rétention du polymère (MIP et NIP) fait intervenir des paramètres régulant les liaisons hydrogène, les interactions hydrophobes et les interactions ioniques. Cependant, la sélectivité de rétention du MIP par rapport au NIP dépend essentiellement des liaisons hydrogène, la présence d'acide acétique dans l'acétonitrile ayant réussi à diminuer notablement la rétention sur le NIP tout en maintenant celle sur le MIP.

Après la caractérisation du MIP, des protocoles SPE ont été élaborés pour l'extraction des triterpènes d'un extrait végétal et pour celle du tamoxifène d'un échantillon urinaire.

- Le premier exemple d'application traite des triterpènes pentacycliques, molécules naturelles hydrophobes dotées de quelques groupements fonctionnels à caractère donneur – accepteur de liaisons hydrogène. Lors de la synthèse de chaque MIP (acide 18- β -glycyrrhétinique, bétuline), l'acide méthacrylique a été utilisé comme monomère et a permis de créer des empreintes spécifiques à la molécule empreinte par formation de liaisons hydrogène. L'acétonitrile a été préféré au chloroforme (solvant porogène) comme solvant de dépôt ou de lavage, car il permet une meilleure suppression des interactions non spécifiques. Appliquée à l'extraction d'une matrice végétale, le MIP a montré une grande spécificité pour sa molécule empreinte, l'acide 18- β -glycyrrhétinique, avec un rendement d'extraction de 98 %.

Enfin, le MIP-bétuline a révélé une certaine réactivité croisée vis-à-vis des triterpènes de structure lupane, avec des recouvrements à l'élution supérieurs à 90 % pour la bétuline et l'acide bétulinique et de l'ordre de 50 % pour le lupéol et l'aldéhyde bétulinique. La fraction obtenue enrichie en triterpènes est exempte d'acides gras, à la différence du protocole de double SPE sur silice greffée C₁₈ – SAX.

- Le second exemple d'application des MIPs a concerné l'extraction du tamoxifène et celle de son métabolite principal dans une matrice aqueuse concentrée en sels minéraux (urine). Deux

MIPs, préparés respectivement à partir d'un seul monomère MAA et d'un mélange de deux monomères MAA 50 % et styrène 50 %, ont été comparés. L'extraction SPE du tamoxifène a été réalisée soit sur un support unique (MIP), ou bien successivement sur deux supports (cartouche polymérique HLB et MIP). Ainsi, quatre protocoles d'extraction ont été mis au point, optimisés et comparés :

- avec le MIP à base du monomère MAA, les rendements obtenus indiquent une élimination plus complète de la matrice urinaire et de meilleurs rendements (56-62 %) en utilisant le double processus (HLB-MIP) plutôt que le processus unique (MIP). Toutefois, quatre étapes de lavage sont nécessaires.

- avec le MIP à base des monomères MAA-styrène 50-50, les rendements obtenus sont très satisfaisants (86-92 %) tant avec le processus unique (MIP) qu'avec le double processus (HLB-MIP). D'autre part, le protocole SPE est beaucoup plus simple avec seulement deux étapes de lavage au total.

Ainsi, l'extraction solide-liquide du tamoxifène et de son métabolite principal contenus dans l'urine est rapide (deux étapes de lavage) et quantitative (rendement 90 %) sur le MIP MAA-styrène (50-50). Le caractère hydrophobe renforcé de ce MIP mixte permet une élimination satisfaisante de la matrice urinaire.

ANNEXES

Annexe I : Caractérisation des solvants (polarité, pouvoirs donneur et accepteur de liaisons hydrogène, caractère dissociant) ([45], chapitre II)

Solvant	Rohrschneider				Hildebrand			
	P'	p_e'	p_d'	p_n'	δ	δ_h	δ_n	δ_d
Tétrahydrofuranne	4,0	<u>1,52</u>	0,80	<u>1,68</u>	9,1	3,9	2,8	8,2
Dichlorométhane	3,1	0,90	0,56	<u>1,64</u>	9,7	3,0	3,1	8,9
Chloroforme	4,1	1,03	<u>1,68</u>	1,35	9,3	2,8	1,5	8,7
Acétonitrile	5,8	1,80	1,57	<u>2,44</u>	11,9	3,0	8,8	7,5
Méthanol	5,1	<u>2,45</u>	1,12	1,58	14,5	10,9	6,0	7,4
Acide acétique	6,0	<u>2,34</u>	<u>1,86</u>	1,80	10,1	6,6	3,9	7,1
Eau	10,2	3,77	3,77	2,55	23,4	20,7	7,8	7,6

P' : polarité des solvants selon Rohrschneider

p_e' : polarité correspondant au caractère accepteur de protons

p_d' : polarité correspondant au caractère donneur de protons

p_n' : polarité correspondant aux interactions dipôle-dipôle

δ : paramètre de solubilité selon Hildebrand ou énergie moléculaire de cohésion ($\text{cal}^{1/2}\text{cm}^{-3/2}$)

δ_h : énergie partielle due aux liaisons hydrogène

δ_n : énergie partielle due aux interactions dipôle-dipôle

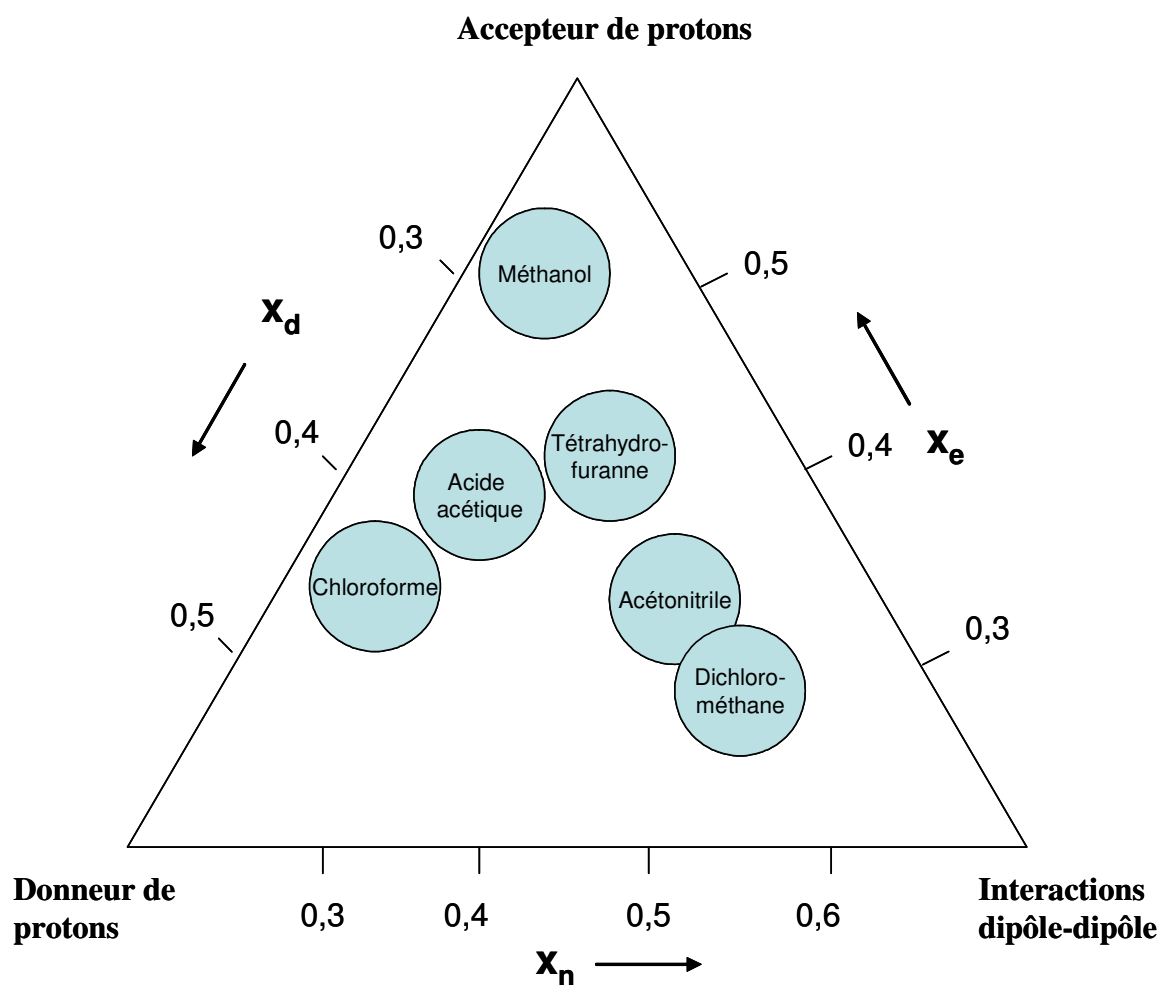
δ_d : énergie partielle due aux interactions de dispersion

Solvant	Caractère prédominant
Tétrahydrofuranne	Interactions dipôle-dipôle
Dichlorométhane	Interactions dipôle-dipôle
Chloroforme	Donneur de liaison hydrogène
Acétonitrile	Interactions dipôle-dipôle
Méthanol	Accepteur de liaisons hydrogène
Acide acétique	Accepteur et donneur de liaisons hydrogène
Eau	Accepteur et donneur de liaisons hydrogène et interactions dipôle-dipôle

Constantes diélectriques à 20°C:

Solvant	CH ₂ Cl ₂	CHCl ₃	CH ₃ CN	CH ₃ OH	(C ₂ H ₅) ₂ O	AcOH	H ₂ O
ϵ_r	9,08	4,806	37,5	32,63	13	6,15	78

Annexe I (suite)



Annexe II : Répartition des métabolites secondaires dans les plantes ([1], chapitre II)

Tissu	Famille de molécules
Trichome	Monoterpène
Trichome	Sesquiterpènes
Trichome	Flavonoïdes
Cire	Triterpènes
Cire	Phénols
Epiderme	Alcaloïdes
Paroi cellulaire	Tannins
Cellule morte	Tannins
Vacuole	Glycosides cyanogéniques
Vacuole	Alcaloïdes
Glande à huile	Furanocoumarines
Glande à huile	Sesquiterpènes
Latex	Di- et Triterpènes
Latex	Sesquiterpènes
Latex	Alcaloïdes
Canaux résinifères	Diterpènes
Semence	Amino-acides non protéiques
Paroi des semences	Furanocoumarines
Ecorce	Quinine

Annexe III : Méthode d'analyse par chromatographie sur couche mince (CCM) appliquée lors du screening phytochimique des extraits de plantes

Conditions opératoires utilisées lors de l'analyse des triterpènes réalisée au Laboratoire LVMH Recherche Produits Actifs (St Jean de Braye, France).

Phase stationnaire : Silice (HPTLC, 10 cm x 10 cm (5 µm), F 254, Merck)

Phase mobile: CHCl₃ / MeOH / H₂O 90 / 20 / 1,5 (v/v/v)

Les proportions doivent être adaptées à la gamme de polarité des triterpènes et saponines analysés. Ainsi, pour des saponines contenant plusieurs molécules de sucres, une phase mobile plus polaire est nécessaire afin de faciliter leur élution (ex : CHCl₃ / MeOH / H₂O 45 / 25 / 4 v/v/v).

Révélateurs: La plaque est ensuite séchée et révélée avec un réactif (la primuline) fluorescent à 366 nm. Un spot blanc-bleuté est significatif de la présence de longues chaînes carbonées non aromatiques. Il s'agit d'un critère structural auquel les triterpènes répondent. De nombreux autres révélateurs permettent de confirmer ou d'infirmer les hypothèses formulées à partir de résultats apportés par d'autres méthodes analytiques.

C'est le croisement des résultats obtenus à partir de différents protocoles CCM (ordre de sortie (R_f) et révélation) qui va permettre de conclure sur l'appartenance d'une molécule à une famille. D'autre part, si certaines molécules absorbent bien en UV, leurs spectres obtenus par un densitomètre complètent leur identification. Cependant, les triterpènes sont souvent dépourvus de groupements chromophores capables de fournir des spectres d'absorption UV caractéristiques.

S.Darnault et al. LABC – Laboratoires LVMH R & D Branche Parfums et Cosmétiques – Saint Jean de Braye – France. International Symposium for TLC – Octobre 2003 – Lyon (France).

Annexe IV : Protocoles de synthèse des MIPs

A) Molécule empreinte : acide 18- β -glycyrrhétinique (Ac- β -Gly)

1) Réactifs :

La molécule empreinte est l'Ac- β -Gly fourni gracieusement par le Laboratoire LVMH Recherche Produits Actifs (St Jean de Braye, France).

Le monomère fonctionnel, l'acide méthacrylique (99 %, Aldrich, $T_{\text{éb}} = 163^{\circ}\text{C}$), noté MAA, est distillé sous pression réduite afin d'éliminer l'hydroquinone (100-250 ppm), inhibiteur de polymérisation. Après distillation, cet acide est conservé à une température de -20°C .

L'agent réticulant, l'éthylène glycol diméthacrylate (98%, Aldrich, $T_{\text{éb}} = 98-100^{\circ}\text{C} / 5 \text{ mm Hg}$), noté EDMA, est soumis à une extraction liquide-liquide en milieu basique puis distillé sous pression réduite afin d'éliminer le monométhyl éther hydroquinone (100 ppm), inhibiteur de polymérisation. Après distillation, l'EDMA est conservé à une température de 4°C .

L'initiateur de polymérisation, le 2,2'-azobis(2-méthylpropionitrile), noté AIBN (98 %, Fluka) est recristallisé à chaud dans le méthanol puis conservé à l'abri de la lumière à 4°C .

Le chloroforme (HPLC grade 99,9 + %, Aldrich, $T_{\text{éb}} = 61^{\circ}\text{C}$) est utilisé comme solvant porogène, sans distillation préalable.

2) Quantités de réactifs utilisées :

Réactif	Quantité	$n_{\text{réactif}} / n_{\text{Ac-}\beta\text{-Gly}}$
Ac- β -Gly	0,326 mmole (153,2 mg)	1
MAA	1,6 mmole (138 mg)	5
EDMA	8 mmole (1615 mg)	25
AIBN	29 mg	$n_{\text{AIBN}} = 1/100 (n_{\text{MAA}} + 2 \times n_{\text{EDMA}})$
CHCl_3	2,55 mL	$V_{\text{CHCl}_3} = 4/3 (V_{\text{MAA}} + V_{\text{EDMA}})$

Tableau 1 : Quantités de réactifs utilisées pour la synthèse du MIP – Ac- β -Gly.

3) *Protocole :*

a) polymérisation :

Dans un tube à vis (volume 10 mL), l'Ac- β -Gly est dissous dans l'acide méthacrylique, l'éthylène glycol diméthacrylate puis le chloroforme dans les proportions indiquées dans le tableau 1. Le mélange est dégazé durant 5 minutes aux ultra-sons. Puis, l'AIBN est ajouté au milieu réactionnel. Le tube est ensuite plongé dans un bain de glace et dégazé sous azote pendant 5 minutes. La polymérisation est initialisée sous agitation, en introduisant le tube fermé hermétiquement dans un bain thermostaté à 60°C. La réaction est poursuivie pendant 21 heures à 60°C.

Un polymère non imprimé (NIP) est préparé en suivant le même protocole mais sans ajout d'Ac- β -Gly.

b) broyage, tamisage :

Le polymère obtenu a l'aspect d'un bloc solide très dur et blanc, appelé "bulk". Il est broyé manuellement dans un mortier et tamisé sur tamis de 45 μm pour récupérer les particules de diamètre inférieur à 45 μm .

c) élimination de l'Ac- β -Gly résiduel :

Le MIP et le NIP sont soumis à 8 extractions successives par 10 mL d'un mélange de MeOH - AcOH 4-1 (v/v) à température ambiante afin d'éliminer l'Ac- β -Gly.

d) décantation :

Après séchage dans un dessiccateur sous vide, les particules sont soumises à des décantations dans l'acétone afin d'éliminer les plus fines particules.

Environ 1500 mg de polymère sont obtenus.

Le MIP et le NIP sont conservés dans un dessiccateur sous vide à 4°C.

B) Molécule empreinte : bétuline

1) Réactifs :

La molécule empreinte est la bétuline fournie par Extra Synthèse (Lyon).

Le monomère fonctionnel, l'agent réticulant, l'initiateur et le solvant porogène sont identiques à ceux utilisés au cours de la synthèse du MIP – Ac-β-Gly.

2) Quantités de réactifs utilisées

Réactif	Quantité	$n_{\text{réactif}} / n_{\text{bétuline}}$
bétuline	0,105 mmole (46,5 mg)	1
MAA	1,6 mmole (138 mg)	15,3
EDMA	8 mmole (1615 mg)	76,2
AIBN	29 mg	$n_{\text{AIBN}} = 1/100 (n_{\text{MAA}} + 2 \times n_{\text{EDMA}})$
CHCl ₃	2,55 mL	$V_{\text{CHCl}_3} = 4/3 (V_{\text{MAA}} + V_{\text{EDMA}})$

Tableau 2 : Quantités de réactifs utilisées pour la synthèse du MIP - bétuline.

3) Protocole :

Le protocole est identique à celui mis en place pour la synthèse du MIP – Ac-β-Gly.

Remarques :

1) Des quantités de monomère et d'agent réticulant plus importantes que celles utilisées pour la synthèse du MIP – Ac-β-Gly sont nécessaires à la dissolution totale de la molécule empreinte dans le mélange de prépolymérisation.

2) Deux polymères non imprimés ont été synthétisés selon l'ajout ou non d'acide acétique à la place de la bétuline.

En effet, pour l'un des polymères imprimés, l'acide acétique (0,210 mmole (= 2 x $n_{\text{bétuline}}$)) a remplacé la bétuline. Le caractère donneur et accepteur de liaisons hydrogène de l'acide acétique devait limiter la formation de dimères MAA-MAA, plus nombreux dans le NIP que dans le MIP à cause de l'absence de molécule empreinte. Il s'avère que le comportement des deux NIPs, préparés avec et sans acide acétique, est identique au cours des différents protocoles SPE.

Environ 1500 mg de polymère sont obtenus. Le MIP et le NIP sont conservés dans un dessiccateur sous vide à 4°C.

C) Molécule empreinte : citrate de clomiphène → MIP A*1) Réactifs :*

La molécule empreinte est le citrate de clomiphène (2-(4-[2-chloro-1,2-diphényléthényl]phénoxy)-N,N-diéthyléthanamine) fourni par Sigma sous forme de mélange cis (43 %) – trans (57 %).

Le monomère fonctionnel (MAA), l'agent réticulant (EDMA) et l'initiateur de polymérisation (AIBN) sont identiques à ceux utilisés pour la synthèse des précédents polymères.

L'acétonitrile (99,9 + %, Aldrich, $T_{\text{éb}}$: 82°C) est utilisé comme solvant porogène, sans distillation préalable.

2) Quantités de réactifs utilisées

Réactif	Quantité	$n_{\text{réactif}} / n_{\text{citrate de clomiphène}}$
citrate de clomiphène	0,2 mmole (120 mg)	1
MAA	1,6 mmole (138 mg)	8
EDMA	8 mmole (1615 mg)	40
AIBN	29 mg	$n_{\text{AIBN}} = 1/100 (n_{\text{MAA}} + 2 \times n_{\text{EDMA}})$
ACN	2,55 mL	$V_{\text{ACN}} = 4/3 (V_{\text{MAA}} + V_{\text{EDMA}})$

Tableau 3 : Quantités de réactifs utilisées pour la synthèse du MIP-clomiphène (MAA).

Le protocole de préparation du MIP (polymérisation, broyage-tamisage, extraction, décantation) reste identique à celui décrit pour les précédents polymères.

D) Molécule empreinte : clomiphène → MIP B*1) Neutralisation du clomiphène :*

Le citrate de clomiphène est dissous dans une solution aqueuse Na_2CO_3 (pH 11, I = 10 mM). Le clomiphène est récupéré sous forme neutre par plusieurs extractions liquide-liquide au chloroforme. La phase organique est séchée sous flux d'azote. On obtient une huile conservée à 4°C.

2) Quantités de réactifs utilisées :

Réactif	Quantité	$n_{\text{réactif}} / n_{\text{clomiphène}}$
clomiphène	0,085 mmole (34,5 mg)	1
MAA	0,34 mmole (29 mg)	4
styrène	0,34 mmole (35,5 mg)	4
EDMA	3,4 mmole (1615 mg)	40
AIBN	12,1 mg	$n_{\text{AIBN}} = 1/100 (n_{\text{MAA}} + 2 \times n_{\text{EDMA}})$
ACN	935 μL	$V_{\text{ACN}} = 4/3 (V_{\text{MAA}} + V_{\text{EDMA}})$

Tableau 4 : Quantités de réactifs utilisées pour la synthèse du MIP-clomiphène (MAA-styrène).

Le styrène (>99,5 %, Aldrich, $T_{\text{éb}} = 145^{\circ}\text{C}$) est introduit, sans distillation préalable, dans le mélange de prépolymérisation.

Le protocole de préparation du MIP (polymérisation, broyage-tamassage, extraction, décantation) reste identique à celui décrit pour les précédents polymères.

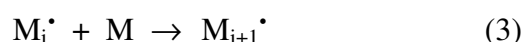
E) Polymérisation radicalaire

Les trois étapes de la synthèse par voie radicalaire d'un polymère sont :

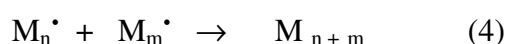
1 → Initiation: (1) Création de radicaux libres (R^{\bullet}) à partir d'une molécule (I) capable de se décomposer par rupture homolytique de liaisons simples covalentes par voie thermique ou photochimique. Puis, (2) addition d'un radical sur une molécule de monomère (M), créant ainsi un nouveau radical libre (M_1^{\bullet}).



2 → Propagation: Addition d'un monomère sur la chaîne radicalaire (M_i^{\bullet}).



3 → Terminaison: La propagation se poursuit jusqu'à ce que deux radicaux libres réagissent ensemble pour former une liaison covalente. Cette ultime étape, appelée terminaison, peut avoir lieu selon l'équation (4).



Annexe V : Conditions chromatographiques d'analyse de l'Ac- β -Gly et de la bétuline

- *Matériel:*

Pompe HPLC Beckman (modèle 126 System Gold)

Vanne d'injection manuelle RHEODYNE modèle 7125 munie d'une boucle d'injection d'un volume de 20 μ L.

Colonne analytique Platinum EPS-C₁₈ (15 cm x 4,6 mm, 5 μ m), Alltech.

Détecteur d'absorption UV-Visible Applied Biosystem, modèle ABI 785A.

- *Phase mobile :*

- ACN / H₃PO₄-NaOH (pH 3,5, I = 20 mM)

75/25 (v/v) pour l'Ac- β -Gly,

80/20 (v/v) pour la bétuline.

La force éluante de la phase mobile est adaptée à la rétention des Ac- α et β -Gly, de la bétuline et des autres triterpènes.

Le tampon H₃PO₄-NaOH (pH 3,5, I = 20 mM) est préparé à partir du logiciel PHOEBUS (Analis, Belgique).

- Débit : 1 mL/min.

- *Détection :*

La détection des Ac- α et β -Gly est réalisée à 254 nm et celle des autres composés triterpéniques à 210 nm.

- *Logiciel d'acquisition :* Gold (V810, Beckman).

- *Droites d'étalonnage obtenues pour l'Ac- β -Gly et pour la bétuline:*

1) Ac- β -Gly (254 nm):

$$\text{de 0 à 20 } \mu\text{g/mL: } y = 0,8246 x - 0,5476 \quad r^2 = 0,9890$$

$$\text{de 20 à 750 } \mu\text{g/mL: } y = 0,9521 x - 2,41 \quad r^2 = 0,9998$$

2) bétuline (210 nm):

$$\text{de 0 à 100 } \mu\text{g/mL: } y = 0,3536 x - 0,0218 \quad r^2 = 0,9997$$

Annexe VI : Protocole de préparation d'un extrait hydrolysé de racines de réglisse

Le protocole est tiré de la Pharmacopée française, édition 2001.

Des racines de réglisse broyées (1g), achetées en pharmacie, et contenant 4 % de glycyrrhizine sont introduites dans 20 mL de chloroforme. L'extraction a lieu sous agitation pendant 15 minutes, à température ambiante. La suspension solide est filtrée sur papier. La phase liquide riche en composés hydrophobes est éliminée.

Le solide récupéré est chauffé à reflux pendant 1 heure dans 30 mL d'une solution aqueuse de H₂SO₄ (1N). Puis la solution est refroidie et extraite deux fois avec 20 mL de chloroforme. Les phases organiques sont regroupées, séchées sur Na₂SO₄ puis filtrées avant d'être évaporées sous flux d'azote à température ambiante.

Le résidu solide est riche en Ac-β-Gly, forme aglycone de la glycyrrhizine. Le protocole d'extraction sur le MIP est appliqué à cet extrait.

Annexe VII : Rappel sur la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

Le couplage CPG-SM est réalisé en introduisant l'extrémité de la colonne capillaire dans une chambre d'ionisation. Le spectromètre est équipé de plusieurs pompes qui maintiennent le vide nécessaire à l'analyse ($P \approx 2.10^{-5}$ Torr = $266,6.10^{-5}$ Pa) avec un débit en gaz vecteur de l'ordre de 1 mL/min. Les composés sortant de la colonne entrent dans la chambre d'ionisation à l'état gazeux et peuvent subir deux types d'ionisation : l'ionisation par impact électronique ou l'ionisation chimique. Nous ne développerons que le premier type d'ionisation, celui-ci ayant été utilisé dans la suite du travail.

1) Ionisation par impact électronique (IE) :

Il s'agit de la méthode la plus fréquemment rencontrée pour l'analyse de composés à l'état gazeux. L'ionisation est provoquée par des collisions avec des électrons d'énergie cinétique élevée (70 eV). Le choc arrache un électron à une molécule neutre (M) la dotant d'une charge élémentaire positive (il se forme environ 1 ion pour 10 000 molécules neutres). Cet ion radicalaire M^+ porté à un état excité se fragmente en ions positifs et en radicaux. Les ions positifs sont acheminés vers l'analyseur, un quadripôle. Le spectre obtenu fait apparaître la masse des différents fragments cationiques avec leurs intensités relatives. La figure 1 illustre le fonctionnement de la chambre d'ionisation.

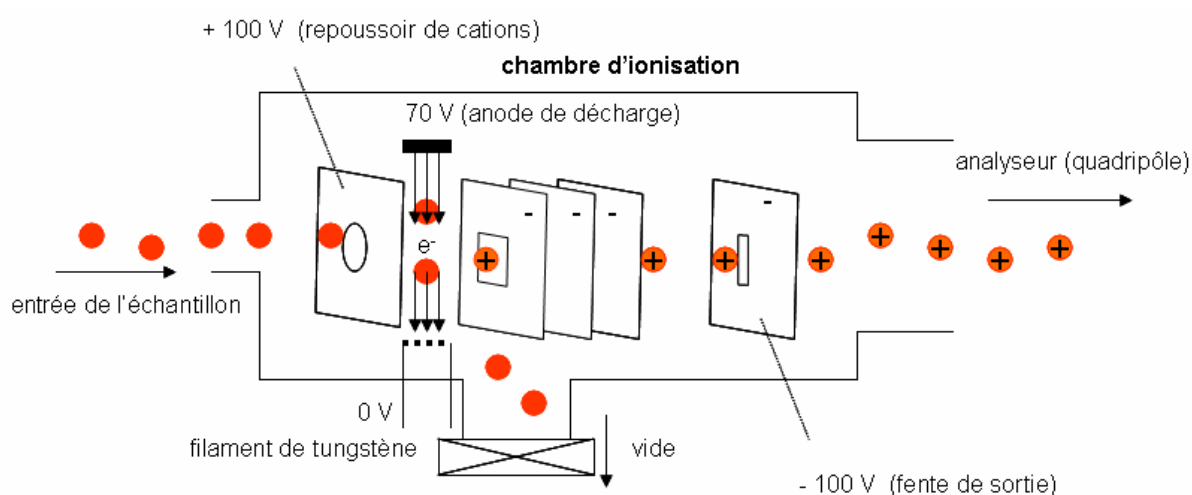


Figure 1 : Schéma d'une chambre d'ionisation.

L'analyseur permet la séparation des ions formés dans la source en fonction de leur rapport masse sur charge (m/z). Un analyseur quadripolaire (**Figure 2**) est constitué de quatre électrodes métalliques hyperboliques couplées deux à deux. Les paires d'électrodes sont de polarités opposées et soumises à une tension ayant une composante continue (U) et une composante alternative ($V \cdot \cos \omega t$). Tout au long de leur parcours à travers l'analyseur, les ions sont attirés par l'électrode de signe opposé et sont repoussés avant de l'atteindre à cause de son changement de signe. Les ions entrant en résonance avec la radiofréquence appliquée poursuivent leur chemin jusqu'au détecteur (électromultiplicateur).

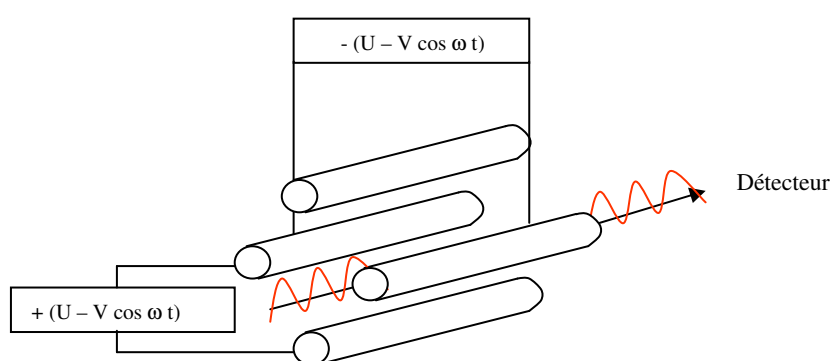


Figure 2: Analyseur quadripolaire.

Le système quadripolaire présente le double avantage de parfaitement transmettre les ions et de présenter une vitesse de balayage m/z très élevée. Le couplage à la CPG est donc réalisé dans des conditions optimales.

2) Réglages du système CPG-SM :

Les analyses ont été réalisées avec un appareil de chromatographie en phase gazeuse *FISONS GC 8000* équipé d'une colonne capillaire *RTX 65 PG* (poly (65% phenyl, 35% dimethyl) siloxane) proposée par le fournisseur pour l'analyse de corps gras tels que les triglycérides. Les dimensions de la colonne sont 30 m x 0,32 mm x 0,10 μm. Le gaz vecteur est l'hélium dont le débit est maintenu constant à 2,5 mL/min.

L'analyse est réalisée avec un gradient de température présentant deux pentes : 80°C (1 min) - 200°C (1 min) à 20°C/min puis 200°C – 320°C (3 min) à 3°C/min.

Un système d'injection automatique *Autosampler FISONS 800* injecte 1 μL d'échantillon avec un rapport de fuite de 1/20. La température de l'injecteur est fixée à 320°C.

L'interface chromatographe – spectromètre de masse est portée à 300°C.

Le spectromètre de masse FISIONS TRIO MIL est réglé à une énergie d'ionisation égale à 70 eV et la température de la source est fixée à 300°C. L'acquisition des chromatogrammes est effectuée en mode TIC (courant ionique total).

Annexe VIII : Préparation d'un extrait méthanolique d'écorces de platane**1) Silylation d'un acide carboxylique :**

Environ 50 µg d'extrait méthanolique d'écorce de platane ou d'étalon commercial sont dissous dans 50 µL d'acétonitrile (99,93 % Biotech. grade solvent, Aldrich) et 50 µL d'agent de dérivation, BSTFA, 5% TMCS (N,O-bis(Triméthylsilyl)trifluoroacétamide) + 5% triméthylchlorosilane (Sigma-Aldrich).

Le mécanisme de la réaction de triméthylsilylation est reporté dans la figure 1 :

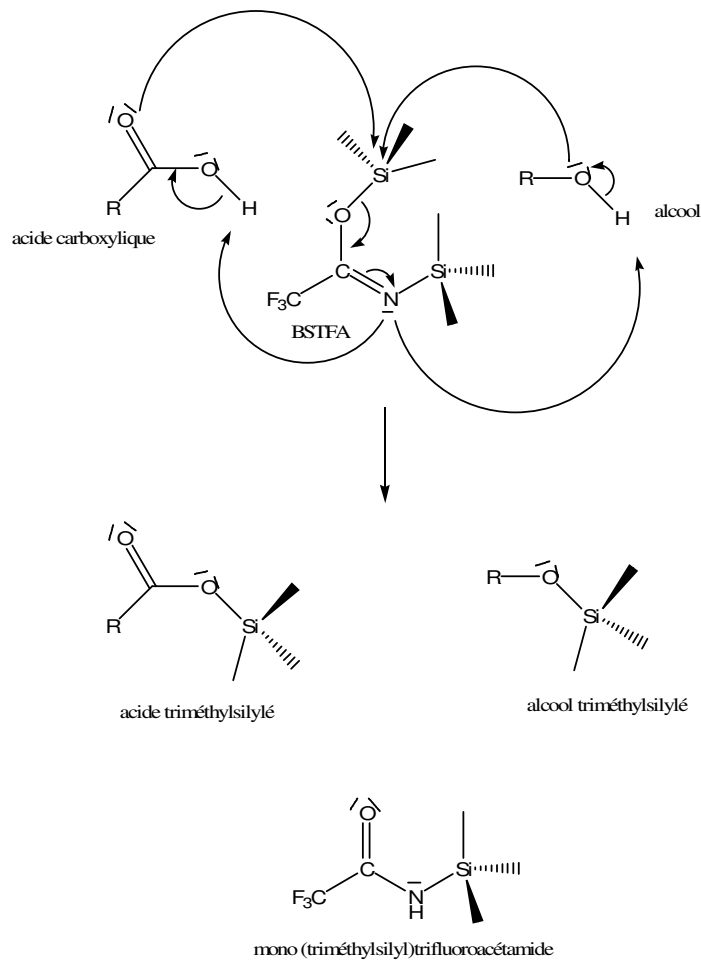


Figure 1 : Triméthylsilylation des acides carboxyliques et alcools par BSTFA.

2) Préparation d'un extrait méthanolique d'écorces de platane avant dérivation et analyse par CPG-SM:

a) SPE sur silice greffée C₁₈ (DSC-18 500 mg/3 mL, Supelco):

43 mg d'extrait méthanolique d'écorces de platane sont mis en suspension dans 4 mL d'un mélange MeOH / H₂O 85/15 (v/v). La solution est filtrée sur filtre lipophile PTFE 0,45 µm. Le filtrat est appelé E.

Etape	Composition du mélange	Volume (mL)
Conditionnement	1) MeOH	4
	2) H ₂ O	4
	3) MeOH / H ₂ O 85/15 (v/v)	4
Dépôt	E	2
Lavage	MeOH / H ₂ O 75/25 (v/v)	4
Elution	MeOH	6

Tableau 1: Protocole SPE Si-C₁₈ appliqué à un extrait méthanolique d'écorces de platane.

b) SPE sur silice greffée triméthylaminopropyle (SAX, 500 mg / 3 mL, 0,85 méq, Varian):

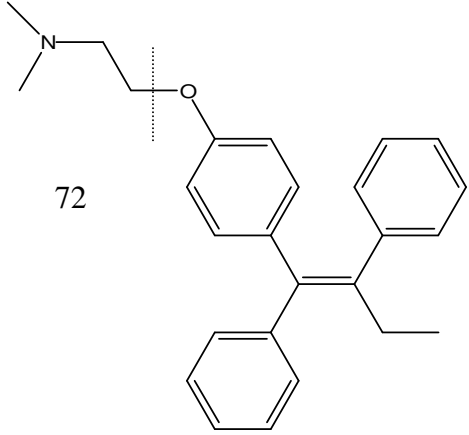
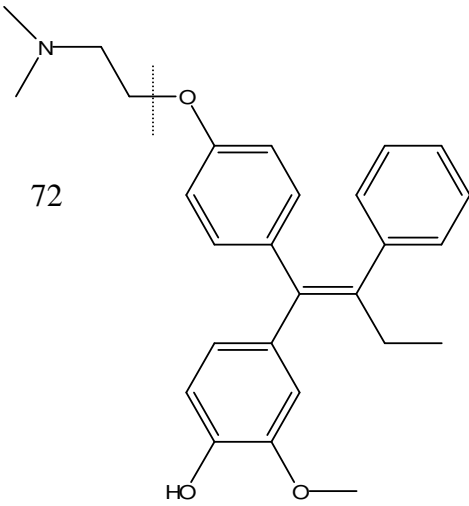
La fraction d'élution de la SPE sur silice greffée C₁₈ est déposée la cartouche SAX selon le protocole décrit dans le tableau 2.

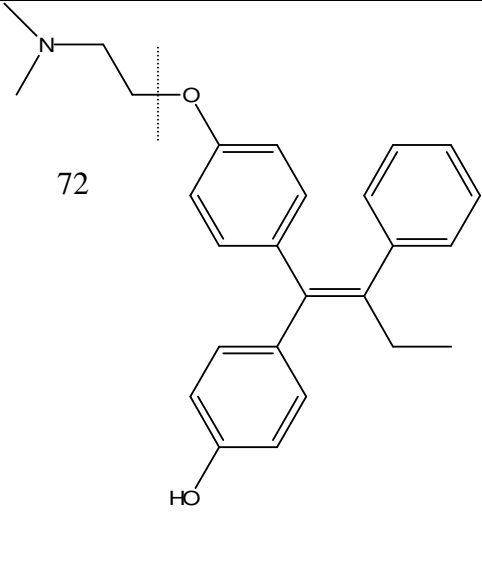
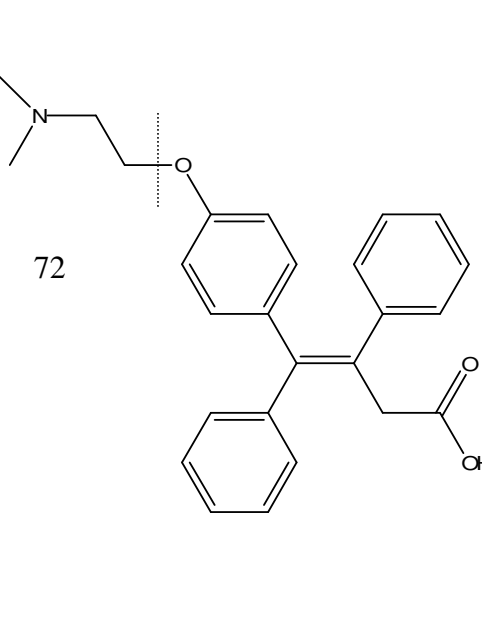
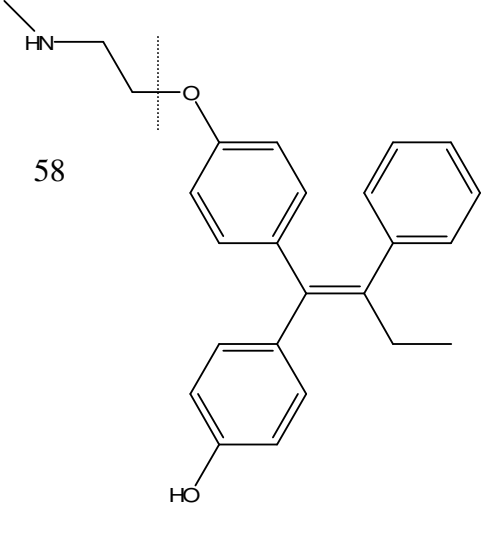
Etape	Composition du mélange	Volume (mL)
Conditionnement	1) MeOH	4
	2) HCO ₃ NH ₄ (pH 7,95; I = 50 mM)	12
	3) MeOH / HCO ₃ NH ₄ (pH 7,95; I = 50 mM) 85/15 (v/v)	2
Dépôt	Elution SPE Si-C ₁₈ séchée et dissoute dans 3 mL MeOH/HCO ₃ NH ₄ (pH 7,95; I = 50 mM) 85/15 (v/v)	3
Lavage	MeOH	4
Elutions 1 et 2	MeOH / AcOH-NH ₃ (pH 3,7; I = 100 mM) 85/15 (v/v)	2
		2

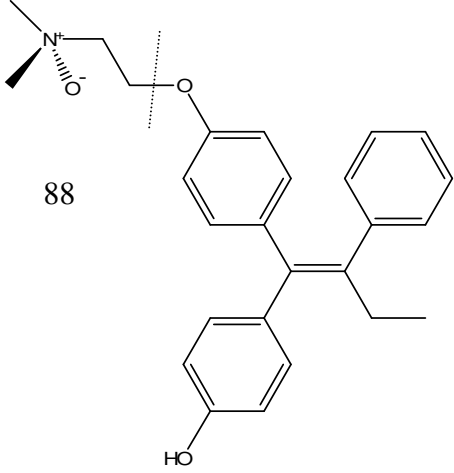
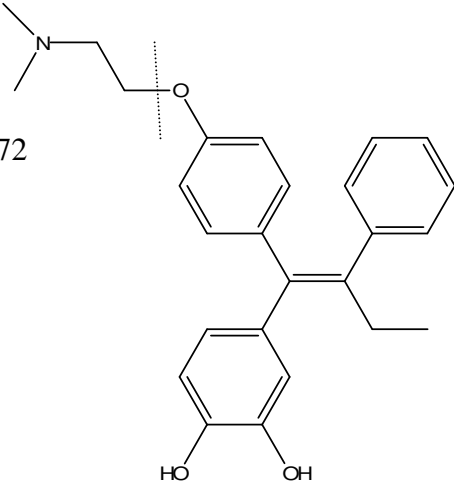
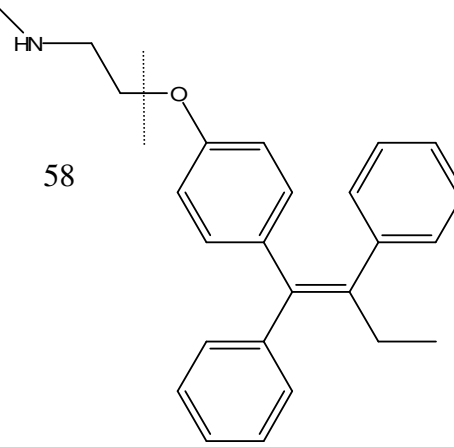
Tableau 2 : Protocole SPE SAX appliqué à l'élution de la SPE Si-C₁₈.

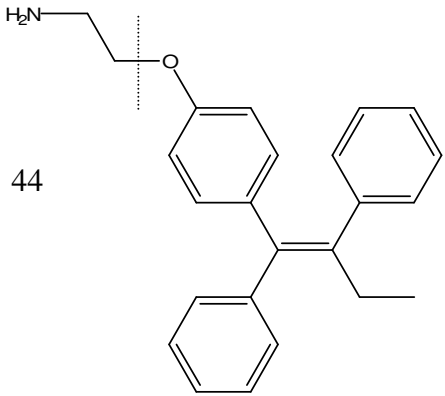
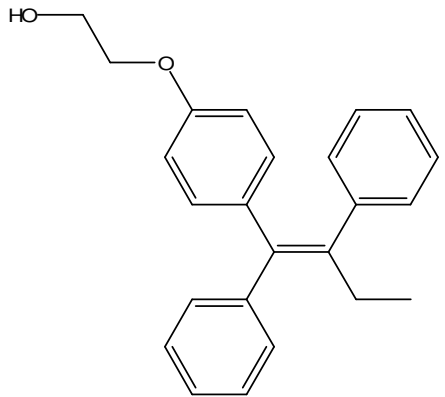
Annexe IX : Métabolites du tamoxifène

Dans la littérature, plusieurs métabolites du tamoxifène ont été identifiés par CPG-SM(/SM) ou CPL-SM(/SM). Des noms ont été proposés par les auteurs.

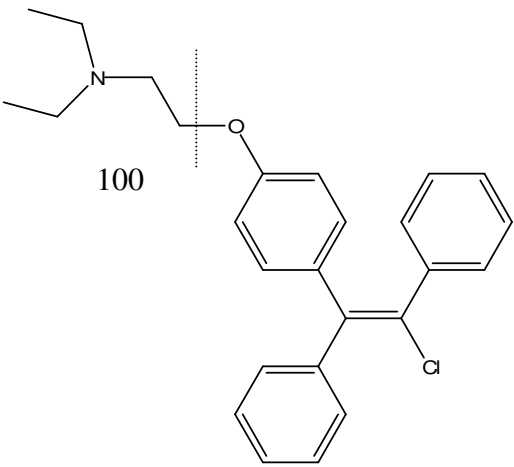
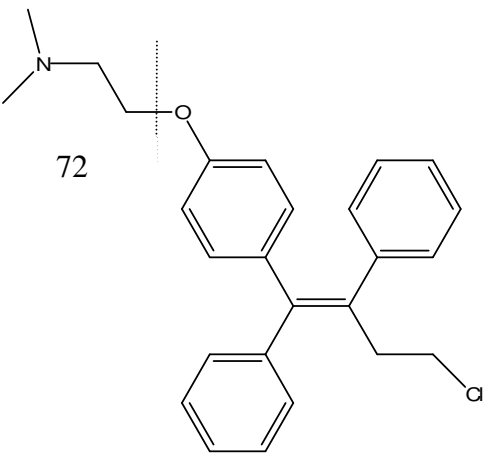
Structure et principal fragment	Nom <i>transition SM/SM</i> <i>m/z (MH⁺) → m/z (fragment principal)</i>	Réf.
 <p>72</p>	<p>tamoxifène (isomère Z) (commercial)</p> <p>372 → 72</p>	
 <p>72</p>	<p>métabolite C</p> <p>4-hydroxy-3-méthoxytamoxifène</p> <p>418 → 72</p>	<p>[9,11]</p>

<p>72</p> 	<p>métabolite B</p> <p>4-hydroxytamoxifène (commercial)</p> <p>388 → 72</p>	<p>[8,15,18-21,23-24]</p>
<p>72</p> 	<p>402 → 72</p>	<p>[11]</p>
<p>58</p> 	<p>métabolite BX</p> <p>4-hydroxy-N-déméthyltamoxifène</p> <p>374 → 58</p>	<p>[23]</p>

<p>88</p> 	<p>N-oxyde tamoxifène 388 → 88</p>	<p>[19]</p>
<p>72</p> 	<p>métabolite D dihydroxytamoxifène 404 → 72</p>	<p>[23]</p>
<p>58</p> 	<p>métabolite X N-déméthyltamoxifène 358 → 58</p>	<p>[8,18-19]</p>

<p>44</p> 	<p>métabolite Z N,N-desdiméthyltamoxifène $344 \rightarrow 44$</p>	<p>[19,21]</p>
	<p>métabolite Y 345 (<i>transition non identifiée</i>)</p>	<p>[18]</p>

Annexe X : Analogues du tamoxifène

Structure et principal fragment	Nom transition MS/MS $m/z (MH^+) \rightarrow m/z (\text{fragment principal})$
 <p>100</p>	<p>clomiphène (isomère Z) (commercial)</p> <p>408 - 410 \rightarrow 100 (2 pics caractéristiques des isotopes du chlore)</p>
 <p>72</p>	<p>torémifène (commercial)</p> <p>408 - 410 \rightarrow 72 (2 pics caractéristiques des isotopes du chlore)</p>

Annexe XI : Conditions chromatographiques d'analyse du tamoxifène et de ses métabolites

- *Matériel:*

Pompe HPLC Merck Hitachi (modèle L-7100 LaChrom)

Vanne d'injection Rheodyne modèle 7125 munie d'une boucle d'injection d'un volume de 20 μL .

Colonne analytique Zorbax Eclipse XDB-C8 (15 cm x 4,6 mm, 5 μm), Agilent.

Détecteur d'absorption UV-Visible Kratos Analytical, modèle Spectroflow 783.

- *Phase mobile :*

Mélange hydro-organique ACN/AcOH-NH₃ (pH 4, force ionique 20 mM)

- Le tampon AcOH-NH₃ (pH 4, I = 20 mM) est préparé à partir du logiciel Phoebus (Analis, Namur Belgique), son pouvoir tampon est égal à 41,0 mmol/pH.

- La composition de la phase mobile varie selon les composés analysés entre 40 et 60 % ACN.

Débit : 1 mL/min

- *Détection :* Le tamoxifène et ses métabolites sont détectés à 240 nm.

Les spectres d'absorption UV du tamoxifène et 4-hydroxytamoxifène sont enregistrés à une concentration de 10 $\mu\text{g/mL}$ dans le méthanol grâce au spectromètre UV-Vis CARY 100 (Varian).

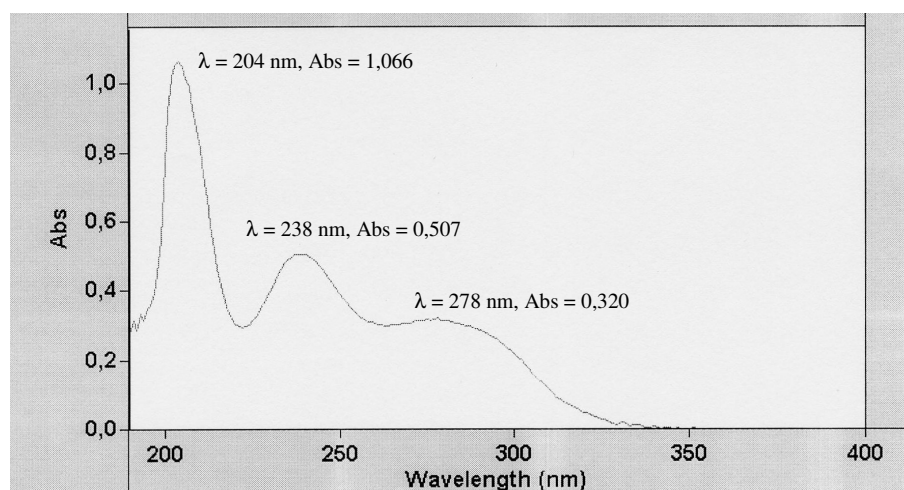


Figure 1 : Spectre d'absorption UV du tamoxifène à 10 $\mu\text{g/mL}$ dans MeOH.

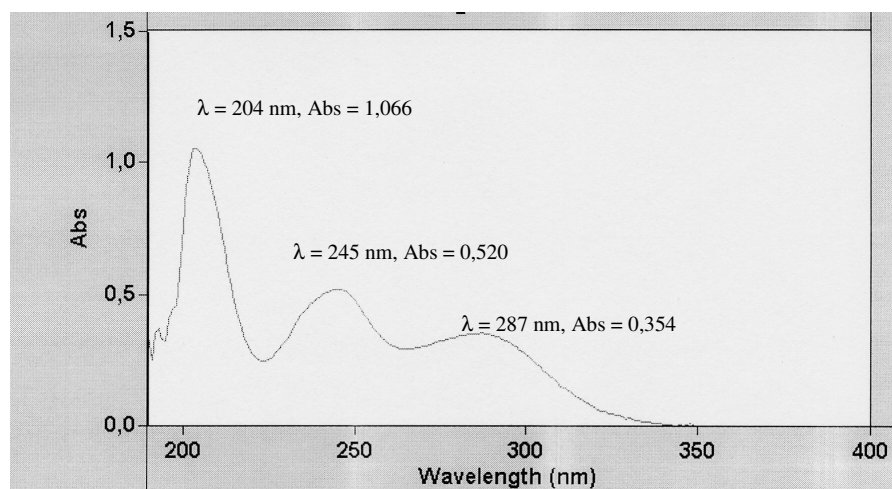


Figure 2 : Spectre d'absorption UV du 4-hydroxytamoxifène à 10 µg/mL dans MeOH.

- *Logiciel d'acquisition* : EZ-Chrom Elite (Merck, version 2.5)
- La gamme d'étalonnage du tamoxifène a été tracée en CPL-UV à partir de six solutions étalons de concentrations comprises dans l'intervalle 0,05 – 1 µg/mL. L'équation de la droite obtenue a été utilisée pour les calculs de recouvrements des protocoles SPE appliqués au MIP et au NIP.

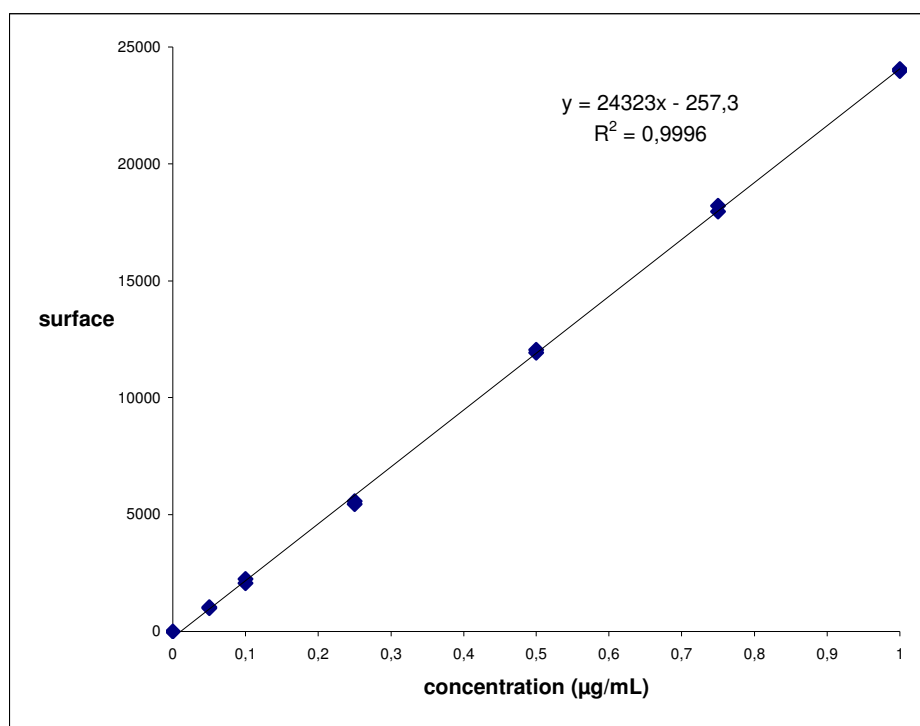
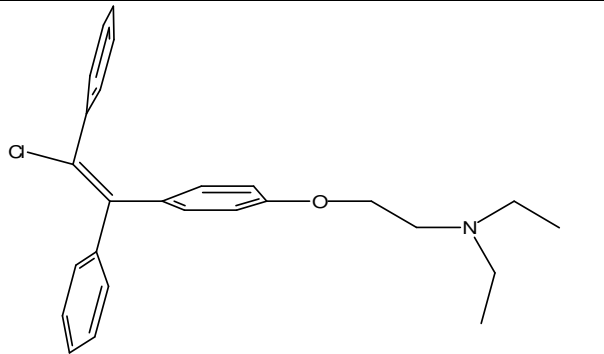
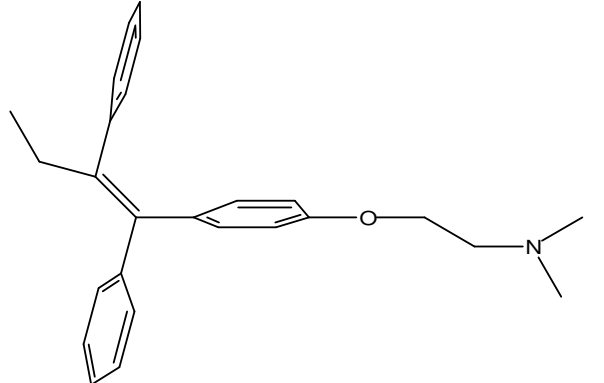
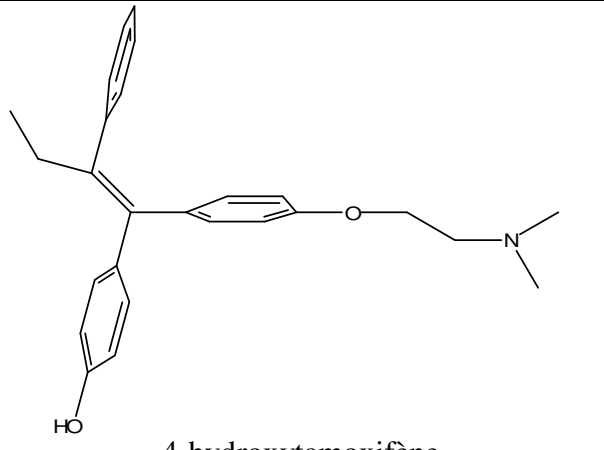


Figure 3 : Droite d'étalonnage du tamoxifène (0,05 – 1 µg/mL) en CPL – UV (240 nm).

- Pour le tracé des isothermes d'adsorption, une gamme d'étalonnage du tamoxifène a été préparée à partir de douze solutions étalon de concentrations comprises dans l'intervalle 0,005 – 2,5 mM (1,8 – 930 µg/mL). Le point haut de la gamme ayant une concentration 500 fois supérieure à celle du point bas, une pondération en 1/x a été réalisée. Ainsi, l'équation de la droite d'étalonnage ($r^2 = 0,993$) obtenue est :

$$y = 11252158 x + 15438$$

Annexe XII : Evaluation du volume moléculaire par modélisation
(Calculs réalisés par le logiciel Moe, Laboratoire de modélisation moléculaire, ICOA)

molécule	volume (Å ³)
 clomiphène	425
 tamoxifène	410,6
 4-hydroxytamoxifène	415

Annexe XIII : Composition moyenne d'une matrice urinaire

Valeurs fournies par l'agence française de lutte contre le dopage (afd) (Châtenay-Malabry). Informations complétées par MadSci Network.

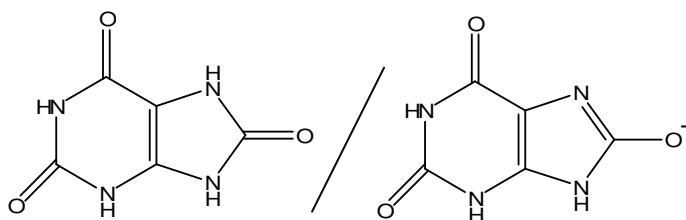
L'urine est composée de 95 % d'eau. Chaque jour, l'organisme génère 1500 mL d'urine en moyenne. Une urine normale a un pH moyen de 5 et une densité comprise entre 1,020 et 1,025. L'urine contient des minéraux ainsi que des composés organiques répertoriés dans le tableau 1.

Composés	[masse minimale (g) – masse maximale (g)] excrétée en 24 h	concentration massique moyenne ($\mu\text{g/mL}$)	pK_A (logiciel Pallas – CompuDrug, Hongrie)
sodium	3 - 7	3300	-
potassium	2 - 4	2000	-
calcium	0,1 - 0,4	166	-
chlorure	4 - 9	4333	-
protéines	< 0,05	-	-
acide urique	0,35 - 1	400	3,9
acide hippurique	(faible chez l'humain)	(faible chez l'humain)	4
urée	10 - 35	15 000	base très faible
créatinine	0,5 - 2,5	1000	4,8
urobilines	0,2 - 3,5	1250	base et acide très faible

Tableau 1 : Composition moyenne d'une matrice urinaire humaine.

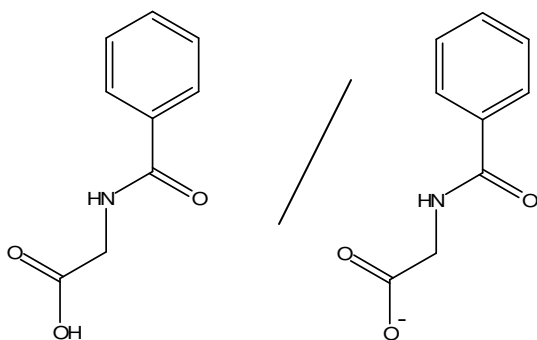
La structure et l'hydrophobie ($\log P$, logiciel Pallas – CompuDrug, Hongrie) des quelques molécules présentes dans l'urine sont mentionnées ci-dessous :

Acide urique:



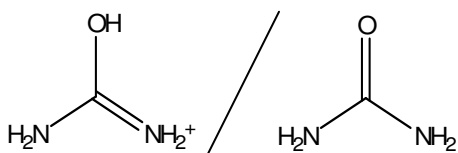
$$\log P = -1,73$$

Acide hippurique:



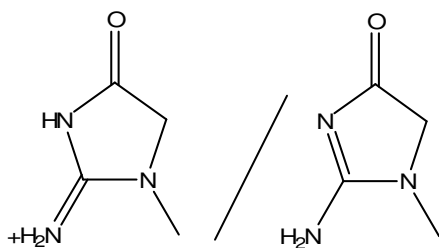
$$\log P = 0,47$$

Urée:



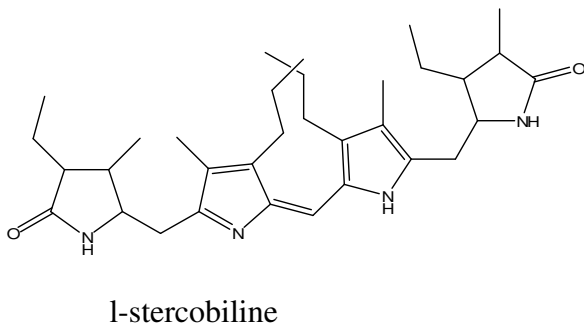
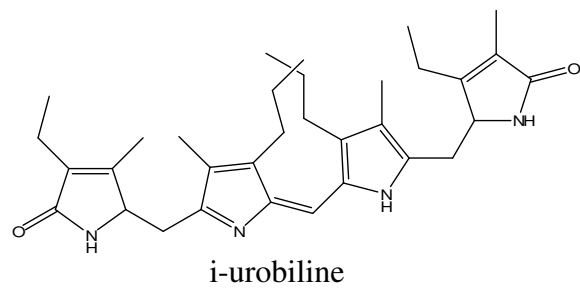
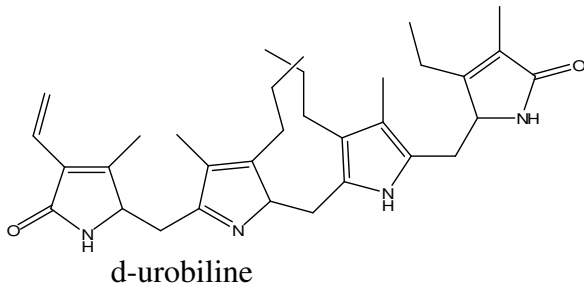
$$\log P = -1,79$$

Créatinine:



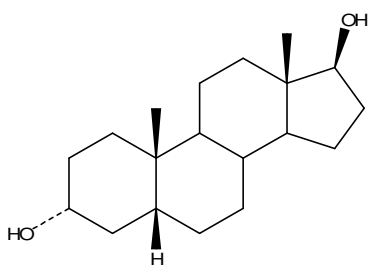
$$\log P = -1,82$$

● Les **urobilines** sont des pigments jaunes retrouvés dans les urines, issus des excréctions biliaires. Trois d'entre elles sont identifiées à ce jour: d, i – urobilines et l-stercobiline.

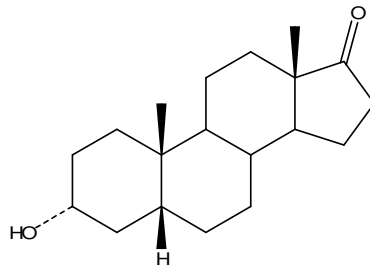


$\log P = 7$ (valeur moyenne obtenue pour les trois types d'urobilines)

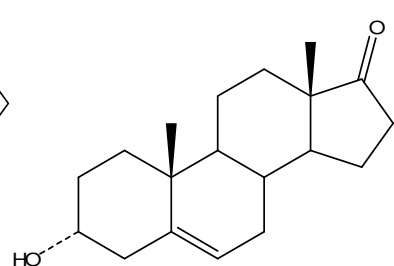
● L'urine contient aussi des **hormones**. Certaines sont retrouvées en quantités importantes (étiocholanolone, androstérone, DHEA (déhydroépiandrostérone)) dans l'urine mâle. Ces molécules sont hydrophobes ($5 < \log P < 5,5$).



Etiocholanolone



Androstérone



DHEA

● L'urine contient aussi des glucides, des vitamines et des acides aminés. La teneur de ces espèces dépend de l'alimentation et du métabolisme de chaque personne.

● L'urine permet d'éliminer l'excédent d'acide présent dans le sang. Il se forme alors des espèces amphotères et des acides minéraux faibles tels que :

☞ l'ion dihydrogénophosphate, H_2PO_4^- , espèce amphotère ($\text{pK}_A (\text{H}_3\text{PO}_4 / \text{H}_2\text{PO}_4^-) = 2,2$ et $\text{pK}_A (\text{H}_2\text{PO}_4^- / \text{HPO}_4^{2-}) = 7,2$),

☞ l'ion ammonium, NH_4^+ ($\text{pK}_A (\text{NH}_4^+ / \text{NH}_3) = 9,2$).

La présence d'acides et de bases faibles en concentration variable dans l'urine provoque des variations de pH dont les valeurs sont comprises entre 5 et 7.

● Le tamoxifène et le 4-hydroxytamoxifène, bases faibles notées B, ont les valeurs suivantes de log P et de pK_A :

☞ $\log P (\text{tamoxifène}) = 7,5$ et $\log P (4\text{-hydroxytamoxifène}) = 7$;

☞ $\text{pK}_A (\text{BH}^+/\text{B}) = 8,8$ pour le tamoxifène (Sigma Prod. No. T5648),

$\text{pK}_A (\text{BH}^+/\text{B}) = 8,1$ pour le tamoxifène (Pallas, CompuDrug),

$\text{pK}_A (\text{BH}^+/\text{B}) = 8,1$ pour le 4-hydroxytamoxifène (Pallas, CompuDrug).

Annexe XIV : Composition chimique des tampons utilisés

Acide/Base	pH	Force ionique (mM)	Pouvoir tampon (mM/pH)	Composition* (mM)
AcOH/NH ₃	4	5	10	[AcOH] = 26,33 [AcO ⁻] = 5 [NH ₄ ⁺] = 4,89 [NH ₃] = 2,53.10 ⁻⁵
AcOH/NH ₂ OH	7	5	10,5	[AcOH] = 2,6.10 ⁻² [AcO ⁻] = 5 [NH ₃ OH ⁺] = 5 [NH ₂ OH] = 52,82
AcOH/NH ₃	10	5	9,8	[AcOH] = 2,57.10 ⁻⁵ [AcO ⁻] = 4,89 [NH ₄ ⁺] = 5 [NH ₃] = 25,87

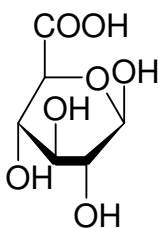
* selon le logiciel Phoebus (Analis, Namur, Belgique).

Après préparation du tampon, le pH est vérifié avec un pH-mètre Beckman Φ 10 pH Meter.

Annexe XV : Hydrolyse des métabolites du tamoxifène par l'enzyme β -glucuronidase

L'enzyme β -glucuronidase est extraite du foie de bovins à partir de la bactérie E.coli. Elle est utilisée dans les méthodes analytiques afin d'hydrolyser la fonction ester créée entre une fonction alcool ou phénol d'un stéroïde et la fonction acide carboxylique de l'acide glucuronique.

La solution de β -glucuronidase est achetée chez Roche Diagnostics (GmbH, Allemagne) ; elle contient 50 % de glycérol, a un pH de 6,5 et est stable entre 2 et 8°C.

acide β -D-glucuronique

L'enzyme peut également être utilisée pour hydrolyser des composés non stéroïdiens glucuro-conjugués, tels que les métabolites du tamoxifène.

Protocole :1) Etape de fixation du pH :

L'urine est filtrée sur un filtre hydrophile en polypropylène de porosité 0,2 μm (GHP Acrodisc Gelman Laboratory) puis son pH est fixé à 6,0 – 6,5 selon deux méthodes:

a) par ajout d'un tampon $\text{NaH}_2\text{PO}_4 - \text{Na}_2\text{HPO}_4$ (force ionique 50 mM),

b) ou, lorsque le pH initial de l'urine est proche de l'intervalle requis, par ajout de quelques gouttes d'une solution concentrée de carbonate de potassium ou d'acide acétique. Après homogénéisation, le pH est à nouveau contrôlé de façon à vérifier sa stabilité.

La première méthode est éliminée car le tampon phosphate ne permet pas une rétention suffisante des composés recherchés sur le MIP. Le tampon $\text{NH}_2\text{OH}-\text{AcOH}$ de même pH, inhibe l'hydrolyse enzymatique.

La seconde méthode est utilisée pour amener l'urine à pH 6,0 – 6,5. L'urine est ensuite diluée avec le tampon $\text{NH}_2\text{OH}-\text{AcOH}$ puis déposée sur le MIP.

2) Etape d'hydrolyse :

Une goutte de la solution commerciale de β -glucuronidase est ajoutée à 4 mL d'urine. Le mélange est homogénéisé puis laissé à 56 °C pendant 60 minutes. Ce protocole a été optimisé au laboratoire d'analyses de l'aflid (agence française de lutte contre le dopage).

La solution hydrolysée est ensuite centrifugée à 4000 tr/min puis déposée sur le MIP (ou le NIP).

Annexe XVI : Caractéristiques de la cartouche Waters HLB

Un support d'extraction sur phase solide est commercialisé par Waters sous le nom HLB (Hydrophilic-Lipophilic Balance). La phase stationnaire est un copolymère à base de divinylbenzène et de N-vinylpyrrolidone. Ce support est capable de retenir les composés analysés sur une large gamme de polarité grâce à ses sites hydrophiles et lipophiles.

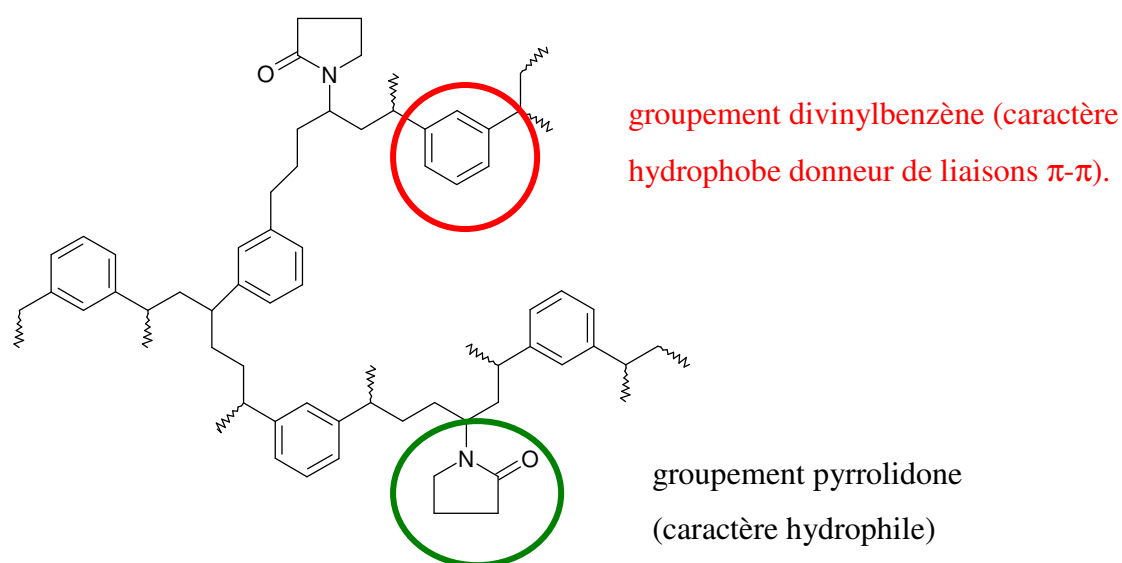


Figure 1 : Structure chimique du copolymère poly(divinylbenzène-co-N-vinylpyrrolidone).

Le tableau suivant reporte les caractéristiques physiques du polymère.

diamètre moyen des pores	8,2 nm
surface spécifique	831 m ² /g
volume poreux total	1,4 cm ³ /g
diamètre moyen des particules	31,4 μ m
proportion de fines particules (< 10 μ m)	0,1 %

Tableau 1 : Caractéristiques physiques de la phase HLB.

Les cartouches HLB sont vendues sous différents formats. Les conditionnements 1mL / 30mg et 3mL / 60mg sont couramment utilisés en développement analytique, notamment lors des analyses chromatographiques de fluides biologiques (sérum, plasma, urine).

Annexe XVII: Conditions d'analyse du tamoxifène et du 4-hydroxytamoxifène par CPL-SM/SM

1) Principe de la source TurboIon Spray:

Le couplage de la colonne est réalisé avec un spectromètre de masse (PE Sciex API 300) doté d'une source TurboIon Spray, variante de l'Electrospray.

La phase mobile sortant de la colonne passe par un capillaire en acier (100 – 200 μm d.i.). Une haute tension est appliquée entre ce capillaire et la contre-électrode située en vis-à-vis (de 2 à 3 kV). Un champ électrique élevé se crée en sortie de capillaire et génère un spray de fines gouttelettes chargées positivement ou négativement selon la polarité choisie (Figure 1).

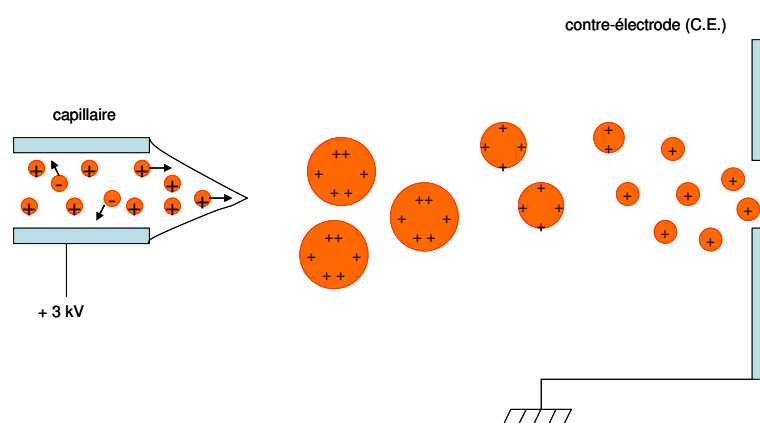


Figure 1 : Principe de l'électrospray avec ionisation en mode positif.

La formation du spray et la désolvation-évaporation sont favorisées par le gaz de nébulisation (N_2), co-axial au capillaire ainsi que par le gaz rideau (N_2), perpendiculaire à la trajectoire des ions et situé derrière la contre-électrode. La contre-électrode est dotée d'un orifice permettant d'amener les ions gazeux formés à l'analyseur. L'ensemble du processus a lieu à température ambiante.

Parmi les développements technologiques favorisant l'évaporation de la phase mobile au cours de l'étape d'ionisation, on trouve le gaz auxiliaire chauffant dans le cas de la source TurboIon Spray (**Figure 2**).

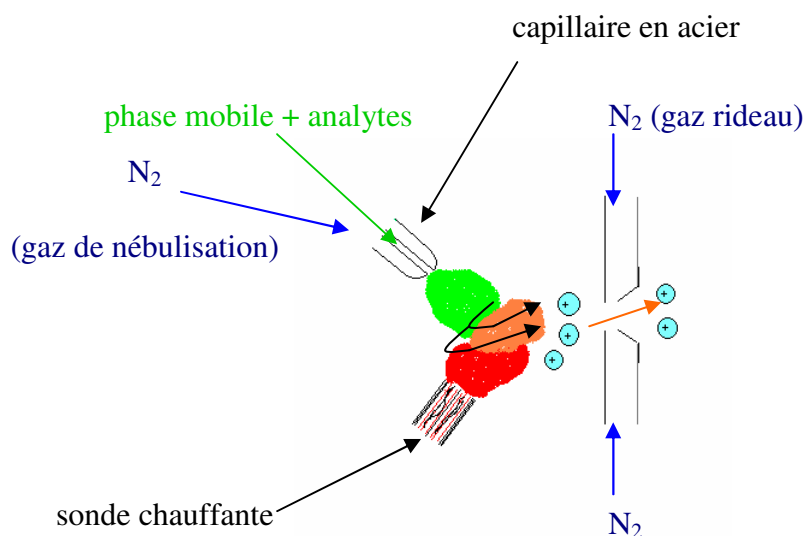


Figure 2 : Source Turbolon Spray.

Quelques conditions analytiques sont à prendre en compte :

- ☞ Le débit de la phase mobile est inférieur à 300 $\mu\text{L}/\text{min}$ pour favoriser l'ionisation dont dépend la sensibilité. Une diminution du débit par un système de split (division) de la phase mobile s'avère alors nécessaire pour les colonnes de diamètre interne 4,6 mm.
- ☞ La phase mobile doit être suffisamment riche en solvant organique (ACN, MeOH) afin d'être volatile. La formation d'ions est aidée par la présence d'eau, voire d'un tampon.
- ☞ Seules les molécules ionisables (acides ou bases faibles) pourront être analysées en mode ESI. La réponse du spectromètre de masse dépend de la concentration des solutés.

2) Analyseur quadripolaire:

L'analyseur permet la séparation des ions formés dans la source en fonction de leur rapport masse sur charge.

Un analyseur quadripolaire (**Figure 3**) est constitué de quatre électrodes métalliques hyperboliques couplées deux à deux. Les paires d'électrodes sont de polarités opposées et soumises à une tension ayant une composante continue (U) et une composante alternative ($V \cdot \cos \omega t$). Tout au long de leur parcours à travers l'analyseur, les ions sont attirés par l'électrode de signe opposé et sont repoussés avant de l'atteindre à cause de son changement de signe. Les ions entrant en résonance avec la radiofréquence appliquée poursuivent leur chemin jusqu'au détecteur (électromultiplicateur).

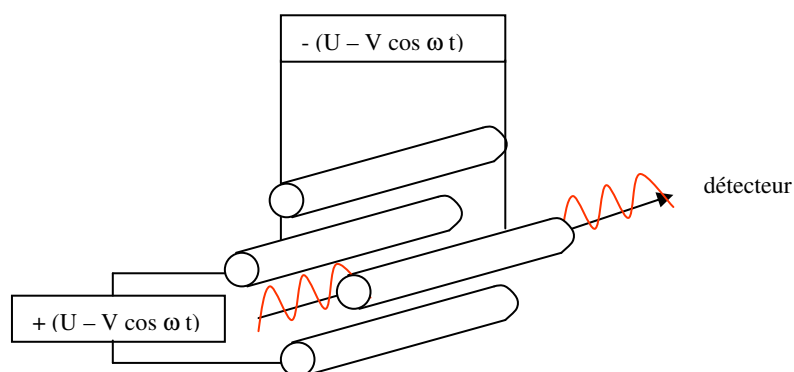


Figure 3 : Analyseur quadripolaire.

Le système quadripolaire présente le double avantage de parfaitement transmettre les ions et de présenter une vitesse de balayage m/z très élevée. Le couplage à une méthode de chromatographie liquide est donc réalisé dans des conditions optimales.

Le montage en série de trois quadripôles permet de faire de la spectrométrie de masse tandem ou SM/SM.

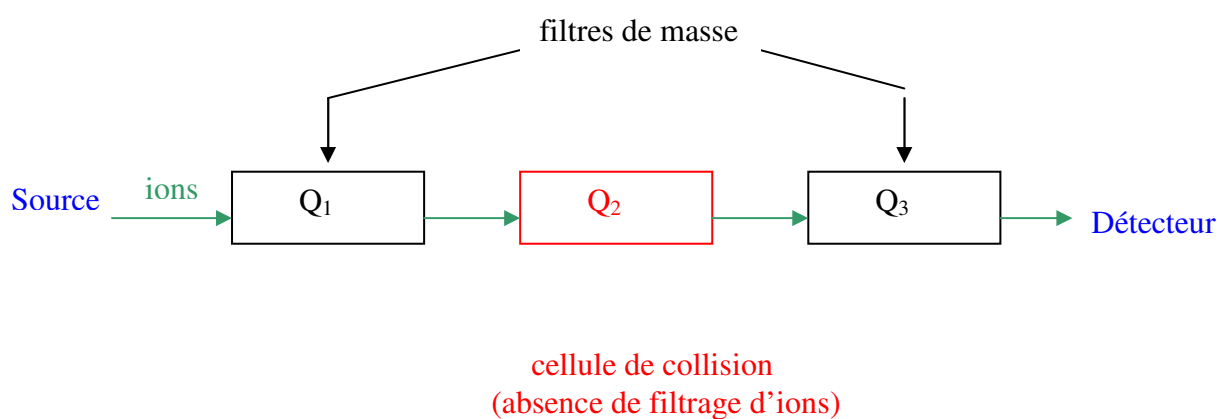


Figure 4 : Principe d'un triple quadripôle.

Q_1 sélectionne un ion (ion parent). Cet ion subit des collisions avec le gaz (argon ou azote) remplissant la cellule de collision (Q_2). Un des ions formés, appelé ion fils est sélectionné au

niveau de Q_3 et transmis au détecteur. Cette double sélection m/z de l'ion parent et de l'ion fils (MRM, Mass Resonance Monitoring) augmente la sensibilité et la sélectivité du signal.

3) Application de la CPL-SM/SM à l'analyse du tamoxifène et du 4-hydroxytamoxifène:

La composition de la phase mobile est ACN / tampon $\text{CH}_3\text{COOH-NH}_3$ (20 mM, pH 4 40/60 (v/v)).

La source TurboIon Spray nécessite un débit de l'ordre de 300 $\mu\text{L}/\text{min}$, obtenu par division du débit en sortie de colonne analytique (4,6 mm d.i. et $D = 1 \text{ mL}/\text{min}$).

Une méthode CPL-SM/SM a permis de tracer une droite d'étalonnage du tamoxifène et du 4-hydroxytamoxifène en vue de l'analyse des fractions d'élution SPE du MIP et du NIP.

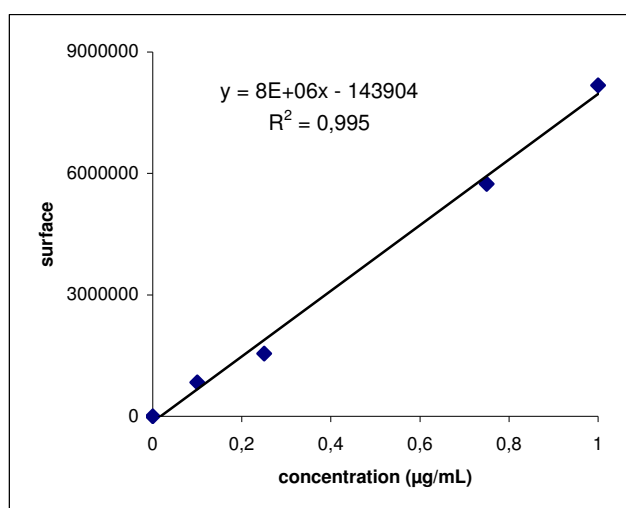


Figure 5 : Droite d'étalonnage externe du tamoxifène par CPL-SM/SM (transition 372/72).

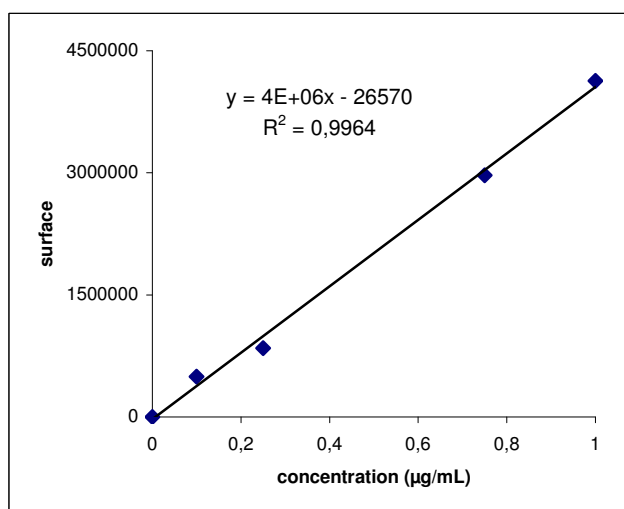


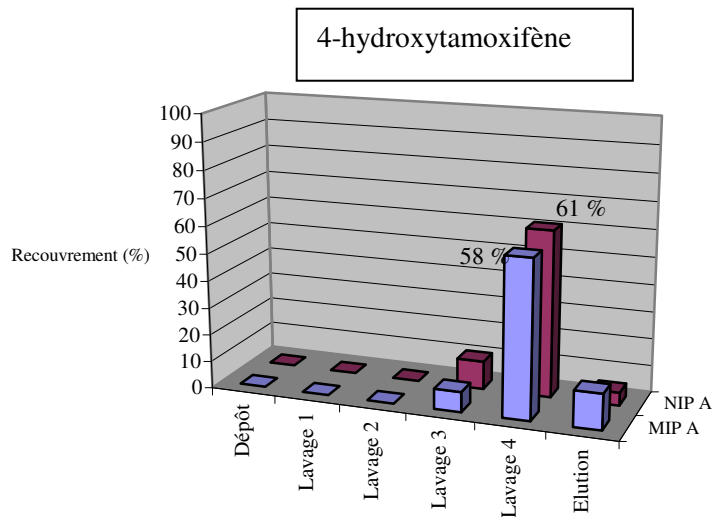
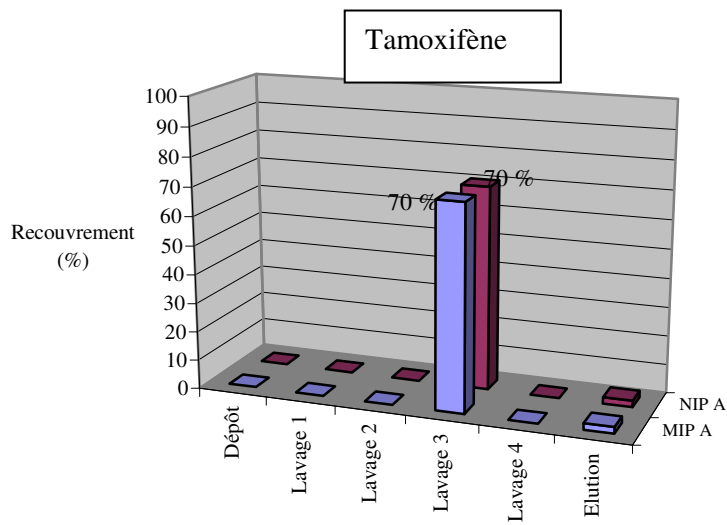
Figure 6 : Droite d'étalonnage externe du 4-hydroxytamoxifène par CPL-SM/SM (transition 388/72).

Annexe XVIII: SPE-MIP A (PROTOCOLE 1) appliquée au tamoxifène et 4-hydroxytamoxifène (0,5 µg/mL) dissous dans le tampon PBS

Composition du tampon aqueux PBS :

KCl	200 mg/L
NaCl	8000 mg/L
KH ₂ PO ₄	200 mg/L
Na ₂ HPO ₄	1150 mg/L

Recouvrements obtenus pour le tamoxifène et le 4-hydroxytamoxifène aux différentes étapes du PROTOCOLE 1 appliqué aux MIP et NIP:



Annexe XIX : Communications écrites et orales

➤ Publications:

- Evaluation of apparent formation constants of pentacyclic triterpene acids complexes with derivatized β - and γ -cyclodextrins by reversed phase liquid chromatography.

B.CLAUDE, Ph.MORIN, M.LAFOSSE, P.ANDRE

Journal of Chromatography A, 1049 (2004) 37-42.

- Rapid analysis of triterpenic acids by liquid chromatography using porous graphitic carbon and evaporative light scattering detection.

B.CLAUDE, N.CAUSSARIEU, Ph.MORIN, L.MORIN-ALLORY, M.LAFOSSE

Journal of Separation Science, 27 (2004) 964-970.

- Molecularly imprinted polymer for a triterpene acid and its application to solid-phase extraction of a plant extract.

B. CLAUDE, Ph. MORIN, A-S. BELMONT, K. HAUPT, M. LAFOSSE

Article soumis à *Journal of Chromatography A*.

➤ Communication orale:

- Modulation des interactions hydrophobes lors de la séparation de solutés apolaires en chromatographie en phase liquide sur silice C_{18} par ajout de cyclodextrines à la phase mobile.

B.CLAUDE, N.REMIRO, Ph.MORIN, M.LAFOSSE, C.VIRON, S.DARNAULT, P.ANDRE

6^{èmes} Journées du Club Français des Cyclodextrines à Montpellier, Janvier 2003.

➤ Communications par affiche:

- Modulation des interactions hydrophobes lors de la séparation de solutés apolaires en chromatographie en phase liquide sur silice C_{18} par ajout de cyclodextrines à la phase mobile.

B.CLAUDE, N.REMIRO, Ph.MORIN, M.LAFOSSE, C.VIRON, S.DARNAULT, P.ANDRE

5^{ème} Congrès Francophone des Techniques Séparatives et des Couplages SEP'03 (Lyon, Mai 2003).

- Set-up of a step-gradient in HPLC on a short length column for a fast and convenient determination of drug-cyclodextrin complexation constants.

B.CLAUDE, Ph.MORIN, M.LAFOSSE

ISC, Paris, Octobre 2004.

- Analysis of pentacyclic triterpenoids from plane bark by gas chromatography-mass spectrometry after a dual sample preparation (C_{18} and strong-anion exchange SPE).

B.CLAUDE, Ph.MORIN, M.LAFOSSE, C.VIRON, S.DARNAULT, P.ANDRE

ISC, Paris, Octobre 2004.

- Preparation of a triterpene acid-molecularly imprinted polymer and application to solid-phase extraction of a plant extract.

B. CLAUDE, Ph. MORIN, A-S. BELMONT, K. HAUPT, M. LAFOSSE

SCBA, Montpellier, Septembre 2005.

- Réalisation d'un polymère à empreintes moléculaires pour l'extraction sélective du tamoxifène et de son principal métabolite de l'urine.

B.CLAUDE, Ph.MORIN, M.LAFOSSE, L.PASCAUD, J.de CEAURRIZ

FORUM LABO 2006, Paris, Mars 2006.

- Selective extraction of tamoxifen and its main metabolite from human urine by using a molecularly imprinted polymer.

B.CLAUDE, Ph.MORIN, M.LAFOSSE, K.HAUPT, L.PASCAUD, J.de CEAURRIZ

MIP 2006, Cardiff, Septembre 2006.

Résumé

Ce mémoire reporte les études menées sur des polymères à empreintes moléculaires (MIP) en extraction solide-liquide (SPE). L'influence de différents facteurs (nature des interactions polymère-analyte, composition de la matrice de l'échantillon, polarité des solvants d'extraction) sur la sélectivité et la capacité des MIPs est étudiée.

La première application révèle l'influence des liaisons hydrogène lors de l'extraction d'un échantillon organique sur un MIP préparé à partir d'acide méthacrylique (MAA). Des expériences de réactivité croisée réalisées sur des molécules analogues à la molécule empreinte (triterpène) montrent l'impact de la nature et de la position des groupes fonctionnels sur la spécificité de reconnaissance des analytes par le MIP. La capacité d'une cartouche SPE est évaluée à partir d'une solution standard puis d'un extrait végétal avec des solvants de lavage adaptés à la matrice.

Les interactions polymère-analyte sont ensuite étudiées dans une matrice aqueuse saline. Deux MIPs respectivement préparés à partir de MAA et de MAA-styrène, avec le clomiphène comme molécule empreinte, sont caractérisés par les isothermes de Freundlich puis appliqués à la préconcentration du tamoxifène, molécule hydrophobe et basique contenue dans des urines hydrolysées et dopées. Les liaisons hydrogène, ioniques et hydrophobes intervenant dans la rétention des analytes sont étudiées par des équilibres d'adsorption et par SPE. La percolation de l'urine sur un support hydrophobe en préalable de la SPE-MIP, ou directement sur un MIP à caractère hydrophobe renforcé (MAA-styrène) entraîne une augmentation des rendements d'extraction avec un nombre d'étapes de lavage réduit.

Summary

This thesis reports results obtained with molecularly imprinted polymers (MIP) during solid-liquid extraction. The effects of various parameters (polymer-analyte interactions, composition of the sample matrix, extraction solvents polarity) on the selectivity and the capacity of the MIP have been studied.

The first application has revealed the influence of hydrogen bonds during extraction of an organic sample with a MIP synthesized with methacrylic acid (MAA). Cross reactivity experiences performed with analogues of the template (glycyrrhetic acid) have proved the power of the nature and the position of functional groups over the specificity of rebinding of the analytes by the MIP. The capacity of the SPE cartridge has been assessed with a standard solution, then with a plant extract and washing solvents adapted to the matrix.

Then, the polymer-analyte interactions have been studied with a saline aqueous matrix. Two MIPs respectively prepared with MAA and styrene-MAA, with clomiphene as template, have been characterized by Freundlich isotherms and applied to the preconcentration of the tamoxifen, a lipophilic and weakly basic molecule contained in hydrolysed urines. Adsorption equilibria and SPE experiments have displayed the part of hydrogen bonds, hydrophobic and ionic interactions in the retention of the analytes. The percolation of the urine through a hydrophobic sorbent before MIP-SPE, or directly through an MIP (MAA-styrene) with enhanced hydrophobic character, has allowed an increase of the extraction recovery with a reduced number of washing-steps.

Mots-clé: Polymère à empreintes moléculaires (MIP), extraction solide-liquide (SPE), triterpènes, tamoxifène, urines.