



HAL
open science

Polymères à empreinte moléculaire pour l'extraction d'un insecticide organophosphoré utilisé en oléiculture : le phosmet

Nadin Aftim

► **To cite this version:**

Nadin Aftim. Polymères à empreinte moléculaire pour l'extraction d'un insecticide organophosphoré utilisé en oléiculture: le phosmet. Polymères. Université de Perpignan, 2017. Français. NNT : 2017PERP0030 . tel-03365104

HAL Id: tel-03365104

<https://theses.hal.science/tel-03365104>

Submitted on 5 Oct 2021

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.

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

Délivré par
UNIVERSITE DE PERPIGNAN VIA DOMITIA

Préparée au sein de l'école doctorale ED 305
Et de l'unité de recherche
Biocapteurs-Analyse-Environnement (BAE)
Laboratoire de Biodiversité et Biotechnologie
Microbienne (LBBM)

Spécialité : Chimie

Présentée par **Nadin AFTIM**

Polymères à empreinte moléculaire pour
l'extraction d'un insecticide organophosphoré
utilisé en oléiculture : le phosmet

Soutenue le 16-11-2017 devant le jury composé de

M. Hugues BRISSET, Professeur, Université de Toulon, France	Rapporteur
Mme Mònica CAMPAS, Docteur HDR, IRTA, Sant Carles de la Rapita, Espagne	Rapporteur
M. Nicolas INGUIMBERT, Professeur, Université de Perpignan Via Domitia, France	Examineur
Mme Béatrice LECA-BOUVIER, Maître de Conférences, Université Lyon 1, France	Examineur
M. Thierry NOGUER, Professeur, Université de Perpignan Via Domitia, France	Directeur de thèse
Mme Carole CALAS-BLANCHARD, Maître de Conférences HDR, Université de Perpignan Via Domitia, France	Co-Directeur de thèse

Remerciements

Je souhaite remercier, en premier lieu, Pr. Hugues Brisset et Dr. Mònica Campas pour avoir accepté d'être les rapporteurs de mon travail de thèse. Je tiens également remercier Pr. Nicolas Inguibert et Dr. Béatrice Leca-Bouvier pour leur participation à mon jury de thèse.

Je remercie, une nouvelle fois, Pr. Nicolas Inguibert mais aussi Dr. Catherine Branger pour leur participation aux comités de suivi de thèse et pour leur inconditionnel soutien.

J'adresse mes remerciements à mes encadrants, Pr. Thierry Noguer et Dr. Carole Calas-Blanchard pour m'avoir accompagnée dans cette aventure autour des MIPs. Je voudrais reconnaître leur aide inestimable, leur patience et leur enthousiasme ainsi que leurs encouragements et leurs conseils tout au long de ce travail. Je ne pouvais prétendre à de meilleurs superviseurs. Leurs contributions par des commentaires détaillés et des idées ont été d'une grande valeur pour moi.

Je voudrais également remercier Dr. Georges Istamboulié pour son aide scientifique et personnelle depuis le début, et Dr. Elena Piletska et Dr. Sergey Piletsky pour les informations fournies sur la modélisation moléculaire et les conseils pour la synthèse des MIPs.

Merci au programme Erasmus Mundus « Peace » de l'Union Européenne, sans lequel le généreux financement de cette recherche n'aurait pas eu lieu. Je remercie aussi l'équipe du Service Universitaire des Relations Internationales de l'UPVD qui a facilité mon installation en France.

Un mot spécial de remerciements aux Professeurs, Docteurs et collègues du laboratoire BAE pour leur amitié et leur soutien. Je voudrais mentionner mes amis qui m'ont aidée à écrire ce mémoire en langue française, l'écrivain Thomas H.V. Dupont et Mme Nouhad Alhage pour leur aide et leur soutien.

Enfin et surtout, un grand « merci » à ma famille, à mes parents, à ma sœur et à mon frère, pour leur soutien inconditionnel et leur encouragement à mener à bien ce projet. Je vous consacre cette thèse, elle est la vôtre.



Sommaire



Table des matières

TABLE DES MATIERES

LISTES DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

Liste des symboles et abréviations

LISTES DES PUBLICATIONS ET DES COMMUNICATIONS

INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE 1 ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	5
1.1. Polymères a empreintes moléculaires (mips)	6
1.1.1. Définition et historique	6
a) Polymérisation	6
b) Principe de l'impression moléculaire	7
c) Historique	7
d) Applications	9
d.1) MIPs comme catalyseurs pour synthèses sélectives	9
d.2) Utilisation des MIPs en chimie analytique	11
➤ Sciences séparatives	11
➤ Capteurs électrochimiques	11
d.3) Usage des MIPs en thérapeutique	12
1.1.2. Synthèse des polymères a empreintes moléculaires	14
a) Différentes approches pour la formation du complexe de pre-polymérisation	15
a.1) Approche covalente	15
a.2) Approche semi-covalente	16
a.3) Approche non-covalente	19
b) Acteur de polymérisation	22
b.1) Molécule empreinte	22
b.2) Monomère fonctionnel	23
b.3) Solvant porogène	25
b.4) Agent réticulant	26
b.5) Initiateur de polymérisation	28

b.6)	Influence de la température	29
c)	Différents formats de polymérisation des mips	29
c.1)	Particules de forme irrégulière, cas de la polymérisation en masse	30
c.2)	MIPs constituées de billes de taille homogène	31
➤	Polymérisation par précipitation	31
➤	Polymérisation en suspension	33
➤	Polymerisation par multi-step swelling	33
➤	Polymérisation core-shell (ou polymérisation noyau enveloppe)	35
1.2.	Insecticides organophosphorés utilisés en oléiculture	36
1.2.1.	Insecticides organophosphorés (OPs)	36
1.2.2.	Mode d'action des OPs (neurotoxiques inhibition AChE)	38
a)	Rôle de l'AChE	39
b)	Structure secondaire et tridimensionnelle	40
c)	Mécanisme d'hydrolyse de l'acétylcholine par l'acétylcholinestérase :	41
d)	Inhibiteurs de l'acétylcholinestérase	42
1.2.3.	Oléiculture et traitements aux OPs	42
1.2.4.	Présence des OPs dans l'huile d'olive	44
1.2.5.	Méthodes d'extraction des organophosphorés	45
a)	Extraction liquide-liquide (ELL)	45
b)	Extraction sur phase solide (SPE)	45
b.1)	Principe	45
b.2)	Diversité des techniques d'extraction sur phase solide	46
b.2.1)	Extraction sur phase solide (SPE)	46
b.2.2)	Extraction par dispersion du support dans l'échantillon (MSPD)	47
b.2.3)	Micro extraction en phase solide sur fibre (SPME)	48
c)	Diversité des supports d'extraction sur phase solide-liquide :	49
c.1)	Supports usuels	49
c.2)	Supports à reconnaissance moléculaire	50
c.2.1)	Anticorps	50
c.2.2)	Polymères à empreinte moléculaires	50
➤	Sélectivité de MIPs pour SPE	51
➤	Etapas d'extraction en utilisant les MIPs	52
➤	MIPS pour l'extraction des OP dans des matrices liquides	53
1.2.6.	Méthodes conventionnelles de détection des organophosphorés	55

a)	Chromatographie en phase gazeuse (CG)	56
b)	Chromatographie en phase liquide (LC)	56
1.2.7.	Méthodes alternatives pour la détection des organophosphorés	57
	REFERENCES CHAPITRE 1 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	59
	CHAPITRE 2 : MATERIELS ET METHODES	70
2.1.	Matériels	71
2.1.1.	Réactifs	71
a)	Solvants	71
b)	Réactifs de synthèse des MIPs	72
2.1.2.	Appareillages	73
a)	Détection des organophosphorés	73
	a.1) Capteur à acétylcholinestérase	73
	a.2) HPLC	75
b)	Synthèse et lavage des MIPs	75
c)	Extraction des organophosphorés par MISPE « Molecularly Imprinted Solid Phase Extraction »	75
2.2.	Méthodes	76
2.2.1.	Méthodes de détection du phosmet	76
a)	Détection par HPLC	76
b)	Détection par biocapteur	77
	b.1) Dosage colorimétrique de l'activité enzymatique	77
	b.2) Méthode d'immobilisation de l'acétylcholinestérase	79
	b.3) Détection ampérométrique des insecticides organophosphorés	80
2.2.2.	Synthèse de MIPs	81
a)	Choix des réactifs et conditions opératoires	81
	a.1) Choix du monomère fonctionnel par modélisation informatique	81
	a.2) Préparation du complexe monomère fonctionnel- phosmet et évaluation par capteur à l'acétylcholine estérase	81
b)	Mode opératoire	83
	b.1) Synthèse de polymères par polymérisation en masse	83
	b.2) Synthèse de polymères par polymérisation en précipitation	84

b.3)	Procédure de lavage	84
2.2.3.	Caractérisation des MIPs	85
a)	Détermination des propriétés d'adsorption	85
b)	Isothermes d'adsorption et modèles	89
b.1)	Modèle de Langmuir	90
b.2)	Modèle de Freundlich	91
b.3)	Analyse de la distribution d'affinité	92
c)	Méthodes expérimentales pour mesurer les isothermes d'adsorption	94
c.1)	Méthode par agitation (en suspension)	94
c.2)	Méthode en flux (flow-through)	94
2.2.4.	Protocole d'extraction des organophosphorés (OPs) (phosmet) sur MISPE	
	« Molecularly Imprinted Solid Phase Extraction »	95
a)	En configuration normale sur colonne classique	96
b)	En flux inverse sur colonne avec un flux ascendant automatisé	97
	REFERENCES CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES	98
	 CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION	100
3.1.	Sélection des réactifs adaptés aux synthèses des MIPs	102
3.1.1.	Approche conventionnelle	105
a)	Pré-sélection de monomères fonctionnels par modélisation moléculaire informatique	105
b)	Synthèse des polymères en masse	106
c)	Etude de la rétention du phosmet sur les différents polymères synthétisés	107
3.1.2.	Approche alternative mettant en jeu un biocapteur à AChE	108
a)	Sélection du monomère fonctionnel et du solvant porogène	109
a.1)	Effet du phosmet préparé dans différents solvants sur la performance analytique du biocapteur	109
a.2)	Effet du complexe phosmet/monomère fonctionnel (pré-polymère) sur le biocapteur en fonction du solvant porogène utilisé	110
a.3)	Effet du temps de contact entre le phosmet et le monomère fonctionnel sur l'inhibition du capteur à AChE	111
a.4)	Effets du MBAA et de l'ACR utilisés aux ratios molaires de 1:4 et 1:8	112
b)	Synthèse des polymères en masse et par précipitation	116

c)	Mise en évidence en batch des empreintes réalisées à partir de différents agents de réticulation	118
c.1)	Choix du solvant utilisé pour tester la capacité d'adsorption	119
c.2)	Influence du ratio éthanol /hexane sur la rétention des polymères synthétisés à partir de chaque agent de réticulation	121
c.3)	Etude des isothermes d'adsorption	124
c.4)	Modélisation des interactions polymère/phosmet	126
3.2.	Extraction du phosmet sur colonne en utilisant les polymères sélectionnés (MISPE)	131
3.2.1.	Choix du solvant de dépôt	131
3.2.2.	Choix du solvant de lavage	133
3.2.3.	Optimisation du solvant de dépôt	140
3.2.4.	Optimisation du solvant de lavage	141
3.2.5.	Etude des performances des cartouches MISPE développées	143
3.2.6.	Etude de la sélectivité de la méthode d'extraction développée	144
3.3.	Extraction du phosmet de l'huile d'olive par MISPE	147
3.3.1.	Optimisation du protocole d'extraction en flux inverse	147
3.3.2.	Comparaison de l'extraction du phosmet en configuration normale et en flux inverse	148
3.3.3.	Extraction du phosmet de l'huile d'olive en flux inverse	149
	REFERENCES CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION	151
	CONCLUSION GENERALE	155
	PUBLICATION	158

Liste des symboles et abréviations

AA : Acide acétique

AChE : Acétylcholinestérase

ACh : Acétylcholine

ACN : Acétonitrile

ACR : Acrylamide

AIBN : 2,2'-Azobis(2-méthylpropionitrile)

AMBN : 2,2'-Azobis(2-méthylbutyronitrile)

ATChCl : Chlorure d'acétylthiocholine

ATChI : Iodure d'acétylthiocholine

BMA : Méthacrylate de butyle

BOP : Peroxyde de benzoyle

CHL : Chloroforme

Co-PC : Phtalocyanine de cobalt

CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse

CPP : Complexe de pré-polymérisation

DTNB : Acide 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoïque)

DMF : N, N- diméthylformamide

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DVB : Divinylbenzène

DEAEM : 2-(Diéthylamino)éthyl méthacrylate

DMAEMA : 2-(Diméthylamino)éthyl méthacrylate

DCE : Dichlorométhane

Eth : Ethanol

EDC : Détecteur à capture d'électrons

EGDMA : Ethylène glycol diméthacrylate

EPA : Agence Américaine de Protection de l'Environnement

EMA : Méthacrylate d'éthyle

ELL : Extraction liquide-liquide

EGMP : Ethylène glycol méthacrylate phosphate

FID : Détecteur à Ionisation de la flamme

FTIR : Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

Hex : Hexane

HPLC : Chromatographie liquide à haute performance

HEM : Hydroxyéthyl méthacrylate

IF : Facteur d'empreinte

IUPAC : Union internationale de chimie pure et appliquée

IA : Acide itaconique

LMR : Limite maximale de résidus

MAA : Acide méthacrylique

MAM : Méthacrylamide

MBAA : N, N-éthylènebis(acrylamide)

MeOH : Méthanol

MIP : Polymère à empreintes moléculaires

MF : Monomères Fonctionnels

MISPE : Extraction sur polymères à empreintes moléculaires

MIPNP : Nano Particules de polymères à empreintes moléculaires

MS : Spectrométrie de Masse

MSPD : Extraction par dispersion du support dans l'échantillon

NBS : N-Bromosuccinimide

NIP : Polymère non imprimé

OC : Organochlorés

ONUAA : Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (ex FAO)

OPs : Organophosphorés

PCB : Polychlorobiphényles

PGC : Carbone Graphitique Poreux

PP : Polymérisation par précipitation

PS-DVB : Polystyrène- divinylbenzène

PVA-AWP : Polyvinyl alcool activé par un groupement azide [Poly(Vinylalcool) Azido-unit pendant Water-soluble Photopolymer]

PVC : Polychlorure de vinyle

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

SPME : Micro extraction en phase solide (sur fibre)

SPE : Extraction sur phase solide

St : Styrène

SWV : Voltammétrie à vague carrée

TFA : Acide trifluoroacétique

TFMAA : Acide 2-(trifluorométhyl)acrylique

TMPTA : Triméthylpropane triéthacrylate

TOL : Toluène

UI : Unité Internationale

2-VP : 2-Vinylpyridine

4- VP : 4-Vinylpyridine

Listes des figures

Figure 1.1. Principe de l'impression moléculaire.	7
Figure 1.2. Evolution du nombre de publications sur les MIPs.	8
Figure 1.3. Utilisation des polymères a empreintes moléculaires.	9
Figure 1.4. Design d'un catalyseur pour la déhydrohalogénéation.	10
Figure 1.5. Approche semi-covalente lors de l'impression moléculaire de l'acide glycérique.	17
Figure 1.6. Approche semi-covalente pour l'impression moléculaire de l'ester L-p-aminophénylalanine d'éthyle.	18
Figure 1.7. Schéma de l'impression moléculaire du cholestérol par voie semi-covalente, composé (1) : carbonate de cholestérol(4- vinyle)phényle.	19
Figure 1.8. Schéma du changement de forme d'un MIP pendant la période de lavage.	23
Figure 1.9. Facteurs influençant la formation de la liaison entre les sites de reconnaissance et les molécules empreintes.	24
Figure 1.10. Structure de la bentazone, molécule cible présentant 2 sites de reconnaissance.	25
Figure 1.11. Structure des principaux agents de réticulation.	27
Figure 1.12. Structure chimique des amorceurs de polymérisation.	28
Figure 1.13. Schéma des différentes techniques de polymérisation.	29
Figure 1.14. Différentes étapes de la polymérisation en masse.	30
Figure 1.15. Description schématique des étapes de polymérisation par précipitation pour la formation des particules de MIP poreux.	32
Figure 1.16. Méthode de préparation de MIPs monodispersés par gonflement et polymérisation en plusieurs étapes.	34
Figure 1.17. Structure générale d'un organophosphoré.	37
Figure 1.18. Réaction d'hydrolyse des organophosphorés.	37
Figure 1.19. Structure chimique du phosmet	38
Figure 1.20. Schéma d'hydrolyse de l'acétylcholine.	39
Figure 1.21. Schéma d'une synapse cholinergique.	39
Figure 1.22. Structure tertiaire de l'acétylcholinestérase (en gris).	40

Figure 1.23. Schéma représentant la localisation des sites dans l'enzyme acétylcholinestérase.	41
Figure 1.24. Schéma du site actif et de la gorge de l'AChE.	41
Figure 1.25. Réaction d'inhibition de l'acétylcholinestérase par les organophosphorés.	42
Figure 1.26. Différents dispositifs pour l'extraction sur phase solide.	46
Figure 1.27. Schéma des étapes d'extraction sur phase solide.	47
Figure 1.28. Schéma d'une extraction de type MSPD par dispersion du support dans l'échantillon.	48
Figure 1.29. Micro-extraction en phase solide sur fibre (SPME).	49
Figure 1.30. Dépôt (b) et lavage (a) sélectif obtenu lors de l'extraction solide-liquide sur MIP.	52
Figure 2.1. Représentation du montage utilisé pour les mesures ampérométriques	74
Figure 2.2. Système à trois électrodes sérigraphiées.	74
Figure 2.3. Extraction des organophosphorés par MISPE.	76
Figure 2.4. Représentation d'une cinétique enzymatique.	77
Figure 2.5. Equation d'hydrolyse de l'acetylthiocholine en thiocholine et acide acétique.	77
Figure 2.6. Détection colorimétrique de la thiocholine par la méthode d'Ellman.	78
Figure 2.7. Principe de l'immobilisation par piégeage dans une matrice de PVA-AWP.	80
Figure 2.8. Structure modélisée du phosmet	82
Figure 2.9. Schéma de détermination de l'effet du complexe phosmet-MF sur le capteur à AChE.	83
Figure 2.10. Représentation des sites de reconnaissance des MIPs.	85
Figure 2.11. Exemple d'isothermes d'adsorption du propranolol obtenus sur MIP et NIP.	90
Figure 2.12. Représentations de la distribution d'affinité basée sur le modèle de Freundlich trace en format semi-log et log.	93
Figure 2.13. (a) méthode d'extraction en configuration normale sur colonne classique, (b) méthode d'extraction en flux inverse sur colonne avec un flux ascendant automatisé.	96
Figure 3.1. Taux de recouvrement obtenus pour les NIPs et MIPs préparés à partir de	

chaque monomère fonctionnel.	107
Figure 3.2. Influence présumée du complexe phosmet- monomère fonctionnel sur le signal issu du biocapteur à acétylcholinestérase.	108
Figure 3.3. Inhibition du capteur à AChE par le phosmet préparé dans chacun des trois solvants (ACN, DMF, DMSO).	110
Figure 3.4. Effet de la nature du monomère fonctionnel et du solvant porogène sur l'inhibition du capteur à AChE.	111
Figure 3.5. Effet du temps d'incubation du phosmet avec le monomère fonctionnel (MBAA, ACR, ou IA) (ratio molaire 1:4 dans le DMSO) sur l'inhibition du capteur à AChE.	112
Figure 3.6. Structures chimiques du N, N'-méthylènebisacrylamide (MBAA) (bi-fonctionnel) et de l'acrylamide (ACR) (monofonctionnel).	112
Figure 3.7. Effet du temps d'incubation phosmet/MBAA et phosmet/ACR aux ratios molaires respectifs 1:4 et 1:8 sur l'inhibition du capteur à AChE.	113
Figure 3.8. Effet du temps d'incubation entre phosmet et MBAA (a), et phosmet et ACR (b), utilisés aux ratios molaires 1:4 et 1:8, sur l'inhibition du capteur à AChE.	114
Figure 3.9. Effet du temps de contact entre le phosmet et les monomères MBAA et ACR (ratio molaire 1:8 dans le DMSO) sur l'inhibition du capteur à AChE.	115
Figure 3.10. Effet de la température sur la cinétique d'inhibition du complexe phosmet-MBAA au ratio molaire 1:8 dans le DMSO sur l'inhibition.	115
Figure 3.11. Isothermes d'adsorption des MIP et NIP synthétisés en utilisant l'EGDMA comme agent réticulant (ratio molaire 1:4:25), déterminés en présence de solutions de phosmet préparées dans l'hexane.	120
Figure 3.12. Capacité d'adsorption Q (axe de gauche) et facteur d'empreinte (IF) (axe de droite) des polymères MIP et NIP synthétisés avec différents agents de réticulation : (a) TMPTA au ratio 1:4:25, (b) TMPTA au ratio 1:4:17, (c) EGDMA au ratio 1:4:25, et (d) DVB au ratio 1:4:25. Evolution en fonction du pourcentage d'éthanol utilisé dans le mélange éthanol/hexane.	122
Figure 3.13. Capacité d'adsorption des MIPs et NIPs synthétisés, déterminée en présence	

de phosmet a 5.10^{-5} M dans un mélange éthanol/hexane approprié (a) MIP _{1TMPTA} et NIP _{1TMPTA} (ratio 1:4:25) (b) MIP _{2TMPTA} et NIP _{2TMPTA} (ratio 1:4:17), (c) MIP _{EGDMA} et NIP _{EGDMA} (ratio 1/4/25), et (d) MIP _{DVB} et NIP _{DVB} (ratio 1/4/25).	124
Figure 3.14. Isothermes d'adsorption des différents polymères (MIPs et NIPs) en présence de concentrations croissantes de phosmet.	125
Figure 3.15. Distributions d'affinité déterminées à partir des isothermes de Freundlich pour les MIPs et NIPs synthétisés en utilisant comme agent de réticulation l'EGDMA ou le DVB	130
Figure 3.16. Pourcentage de phosmet récupéré dans le percolât issu du solvant de dépôt du phosmet sur les MIP et NIP, en fonction de la nature du solvant utilisé.	132
Figure 3.17. Pourcentage de phosmet récupéré dans le percolât issu du lavage des MIP et NIP, en fonction du solvant utilisé.	134
Figure 3.18. Pourcentage de phosmet récupéré dans le percolât après lavage des MIP et NIP avec 2 mL de solvant, en fonction du solvant utilisé.	135
Figure 3.19. Pourcentage de phosmet récupéré dans les percolâts de dépôt, de lavage et d'élution des MIP et NIP en utilisant le protocole d'extraction 1 décrit dans le tableau 3.11 (n=3).	137
Figure 3.20. Pourcentage de phosmet récupéré dans les percolâts de dépôt, de lavage et d'élution des MIP et NIP en utilisant le protocole d'extraction 2 décrit dans le tableau 3.12 (n=3).	138
Figure 3.21. Influence de la composition du solvant de lavage (éthanol/hexane) sur la quantité de phosmet (%) récupéré dans les percolâts de lavage et d'élution des MIP et NIP (volume de lavage 3 mL, n=3).	139
Figure 3.22. Pourcentage de phosmet récupéré dans le percolât de dépôt en fonction de la composition du solvant de dépôt (pourcentage d'éthanol contenu dans le mélange hexane/éthanol) (n=3).	140
Figure 3.23. Influence de la composition du solvant de lavage (éthanol/hexane) sur la quantité de phosmet (%) récupérée dans les percolâts de lavage et d'élution des MIP et NIP (suivant le protocole 3, n=3).	142

Figure 3.24. Taux de recouvrement obtenus après extraction du phosmet sur MIP (bleu) et NIP (rouge) suivant le protocole 4, en fonction de la quantité de Phosmet déposée (en mol) (n=3).	143
Figure 3.25. Structures chimiques du phosmet et du diméthoate	144
Figure 3.26. Taux de recouvrement obtenus lors de l'extraction du diméthoate sur MIP et NIP en utilisant le protocole 4 (dépôt de 10mL de diméthoate de $4,8 \cdot 10^{-7}$ M à $2,6 \cdot 10^{-6}$ M) (n=3).	145
Figure 3.27. Taux de recouvrement obtenus lors de l'extraction d'un mélange du phosmet et diméthoate sur MIP et NIP selon le protocole 4 (dépôt de 10 mL de phosmet ($8,3 \cdot 10^{-8}$ M, $6,2 \cdot 10^{-7}$ M) et de diméthoate ($1,9 \cdot 10^{-7}$ M, $1,2 \cdot 10^{-7}$ M)) (n=3).	146
Figure 3.28. Taux de recouvrement obtenus lors de l'extraction du mélange du phosmet sur MISPE en flux inverse selon le protocole 5 (dépôt de 10 ml de phosmet a 10^{-6} M et 10^{-7} M) (n=3).	148
Figure 3.29. Taux de recouvrement obtenus pour les étapes de lavage et d'élution lors de l'extraction du phosmet de l'huile d'olive sur MISPE selon le protocole 5 (n=3).	150

Liste des tableaux

Tableau 1.1. Fonctions caractéristiques de la molécule cible, du monomère fonctionnel et du complexe forme lors d'approches covalentes.	15
Tableau 1.2. Structure des principaux monomères fonctionnels	20
Tableau 1.3. Production et consommation moyennes d'huile d'olive en Europe et dans certains pays du monde entre 2010 et 2016 (IOOC 2016)	43
Tableau 1.4. Méthodes d'extraction de différents organophosphorés sur MIPs	54
Tableau 2.1. Solvants utilisés et leur degré de pureté.	71
Tableau 2.2. Produits et réactifs utilisés, structures et degré de pureté.	72
Tableau 2.3. Produits et réactifs utilisés, structures et degré de pureté.	76
Tableau 2.4. Protocole de mesure de l'activité enzymatique de l'acétylcholinestérase.	78
Tableau 3.1. Synthèse bibliographique des MIPs développés pour l'extraction en phase solide de composés à partir de matrices réelles, couplée hors ligne ou en ligne avec des méthodes analytiques (principalement chromatographie liquide).	103
Tableau 3.2. Energies de liaison entre le phosmet (molécule cible) et les différents monomères fonctionnels.	105
Tableau 3.3. Conditions de synthèse des polymères (MIPs et NIPs).	117
Tableau 3.4. Caractéristiques chimiques du phosmet et des différents agents de réticulation.	119
Tableau 3.5. Valeurs de facteurs d'empreinte (IF) des quatre MIPs synthétisés en fonction du pourcentage d'éthanol contenu dans le mélange éthanol/hexane.	123
Tableau 3.6. Coefficients de corrélation et composantes des régressions linéaires obtenues.	127
Tableau 3.7. Capacité maximale d'adsorption et constantes de Langmuir.	127
Tableau 3.8. Coefficients de corrélation et composantes des régressions linéaires obtenues.	129
Tableau 3.9. Propriétés physico-chimiques des solvants et produits utilisés lors des étapes de synthèse et d'extraction du phosmet.	132
Tableau 3.10. Facteurs d'empreinte (IF) obtenus en fonction du solvant utilisé.	135

Tableau 3.11. Protocole d'extraction en phase solide appliqué aux MIP et NIP (protocole 1).	136
Tableau 3.12. Protocole d'extraction en phase solide appliqué aux MIP et NIP (protocole 2).	137
Tableau 3.13. Facteurs d'empreinte (IF) obtenus en fonction de la composition du solvant de lavage (pourcentage d'éthanol dans le mélange éthanol/hexane).	139
Tableau 3.14. Protocole d'extraction en phase solide appliqué aux MIP et NIP (protocole 3).	141
Tableau 3.15. Facteurs d'empreinte (IF) obtenus suivant le protocole 3 en fonction de la composition du solvant de lavage (pourcentage d'éthanol dans le mélange éthanol/hexane).	142
Tableau 3.16. Protocole d'extraction en phase solide appliqué aux MIP et NIP (protocole 4).	143
Tableau 3.17. Facteurs d'empreinte (IF) obtenus suivant le protocole 4 en fonction de la quantité de phosmet déposée (en mol) (concentrations comprises entre $7,4 \cdot 10^{-8}M$ et $3,4 \cdot 10^{-6}M$).	144
Tableau 3.18. Coefficients de sélectivité (k) et de sélectivité relative (k') obtenus pour lors de l'extraction des 2 mélanges de phosmet et de diméthoate.	146
Tableau 3.19. Protocole d'extraction en phase solide appliqué aux MIP et NIP pour l'extraction du phosmet de l'huile d'olive en flux inverse (protocole 5).	147

Listes des publications et des communications

PUBLICATIONS

Aftim, N., Istamboulié, G., Piletska, E., Piletsky, S., Calas-Blanchard, C., Noguier, T. (2017). Biosensor-assisted selection of optimal parameters for designing molecularly imprinted polymers selective to phosmet insecticide. *Talanta*, 174, pp 414–419.

COMMUNICATIONS ORALES

Aftim, N., Istamboulié, G., Calas-Blanchard, C. & Noguier, T. AchE-Based Sensor Control of Monomer-Template Interaction for Designing MIPs Selective to Phosmet Insecticide. 21 th Transfrontier Meeting of Sensors and Biosensors. 30 Septembre, 2016, Barcelona, Spain.

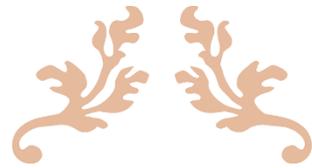
COMMUNICATIONS PAR POSTER

Aftim, N., Istamboulié, G., Piletska, E., Piletsky, S., Calas-Blanchard, C. & Noguier, T. Biosensor-based selection of functional monomers for designing phosmet MIPs usable in olive oil analysis. International Conference on Molecular Imprinting. June 26-30, 2016 Lund, Sweden.

Aftim, N., Istamboulié, G., Calas-Blanchard, C. & Noguier, T. Synthesis of molecularly imprinted polymers by precipitation polymerization for the selective extraction of phosmet from olive oil. 20th Transfrontier Meeting of Sensors and Biosensors. 1-2 Octobre, 2015, Perpignan, France.

Aftim, N., Istamboulié, G., Calas-Blanchard, C. & Noguier, T. Polymères à empreintes moléculaires pour la detection du phosmet. 4^o Congrès des Doctorants de Perpignan. 6-7 novembre, 2015, Perpignan, France.

Aftim, N., Istamboulié, G., Calas-Blanchard, C. & Noguier, T. Computational and biosensor investigation of molecular imprinted polymers for selective extraction of phosmet from olive oil. 7th International symposium on Recent Advances in Food Analysis (RAFA 2015), 3-6 Novembre 2015, Prague, Czech Republic.



Introduction générale



Introduction générale

Depuis les années 1950, l'agriculture industrielle a banalisé l'utilisation massive de composés chimiques de synthèse, appelés produits phytosanitaires ou plus communément pesticides. Ces composés sont utilisés afin de lutter contre les organismes vivants indésirables pour les cultures mais sont parfois répandus de façon seulement préventive, alors même que les cultures ne sont victimes d'aucune maladie ou d'aucun parasite. Parmi les pesticides, les organophosphorés (OPs) représentent plus de 40 % des insecticides employés aujourd'hui dans le monde. Ces composés ont pour cible une enzyme indispensable pour la transmission de l'influx nerveux chez les insectes, l'acétylcholinestérase (AChE).

Nous sommes tous exposés à ces pesticides au travers de notre environnement et de notre alimentation. Au niveau de l'agroalimentaire, la tendance actuelle à la consommation de produits sains s'accompagne de la nécessité de développer des méthodes analytiques sensibles et performantes permettant déceler des traces éventuelles de polluants. Les méthodes utilisées pour la détection des insecticides organophosphorés peuvent être des méthodes chromatographiques dites conventionnelles ou des méthodes alternatives comme les biocapteurs enzymatiques. Cependant, toutes ces techniques ont besoin d'une étape de purification ou de pré-concentration des OPs avant leur analyse pour permettre une identification et une quantification aisée.

Cette étude porte plus particulièrement sur le phosmet, un insecticide organophosphoré notamment utilisé dans le traitement de l'olivier, contre la mouche de l'olive (*Bactrocera oleae*) et couramment retrouvé dans l'huile. Afin de pouvoir extraire ce composé de l'huile tout en éliminant une grande majorité d'interférents, des supports sélectifs basés sur un mécanisme de reconnaissance moléculaire peuvent être envisagés. Dans ce contexte, une méthode intéressante a consisté à utiliser des supports polymériques à empreintes moléculaires ayant une complémentarité stérique et fonctionnelle avec la molécule cible. Ces polymères sont généralement préparés à partir de monomères fonctionnels polymérisés autour d'une molécule cible, à l'aide d'un agent réticulant et en présence d'un initiateur, et servent de sites de reconnaissance des molécules imprimées. L'objectif de cette étude a donc été de synthétiser des polymères à empreintes moléculaires (MIPs) spécifiques du phosmet afin de pré-concentrer sélectivement ce composé avant une analyse chromatographique par HPLC.

Le premier chapitre de ce mémoire est un recueil de la bibliographie sur les fondements de la synthèse et de la caractérisation des MIPs, les applications des MIPs dans différents

domaines, ainsi que sur l'utilisation des OPs en oléiculture et les méthodes de détection de ces composés.

Le deuxième chapitre décrit ensuite le matériel utilisé et les méthodes mises en œuvre pour synthétiser et caractériser des MIPs, ainsi que le protocole d'extraction du phosmet et de sa détection par HPLC.

Le troisième chapitre décrit les résultats qui sont présentés selon leur ordre chronologique pour obtenir le meilleur MIP pour le phosmet.

Dans un premier temps, nous avons recherché une méthode définissant la meilleure interaction entre le monomère fonctionnel et la cible. La modélisation informatique a permis de calculer l'énergie de liaison entre plusieurs monomères fonctionnels et le phosmet puis de sélectionner les meilleurs candidats. Nous avons ensuite étudié l'interaction entre le phosmet et les trois monomères fonctionnels précédemment sélectionnés au travers d'une approche originale par biocapteur, basée sur la mesure du pouvoir inhibiteur du complexe monomère fonctionnel/phosmet sur l'acétylcholinestérase. Les trois meilleurs monomères ont été utilisés pour synthétiser des MIPs.

Dans un second temps, la modélisation des phénomènes d'adsorption nous a permis, par le biais de l'étude des isothermes d'adsorption, de déterminer les agents réticulants permettant d'obtenir les MIPs les plus adaptés. Nous avons ensuite optimisé le protocole d'extraction solide-liquide en utilisant les MIPs retenus.

Enfin, les MIPs ainsi synthétisés ont été appliqués à l'extraction des organophosphorés de l'huile d'olive.



Chapitre 1

Etude bibliographique



Chapitre 1 : Etude bibliographique

1.1. Polymères à empreintes moléculaires (MIPs)

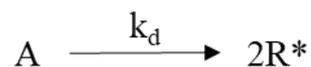
1.1.1. Définition et historique

a) Polymérisation

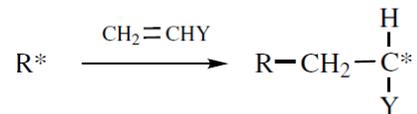
La plupart des MIPs ont été synthétisés en utilisant la polymérisation radicalaire en chaîne au moyen de monomères insaturés. La polymérisation en chaîne se déroule en trois étapes :

- Amorçage : un initiateur (ou un amorceur) a été décomposé en deux espèces réactives

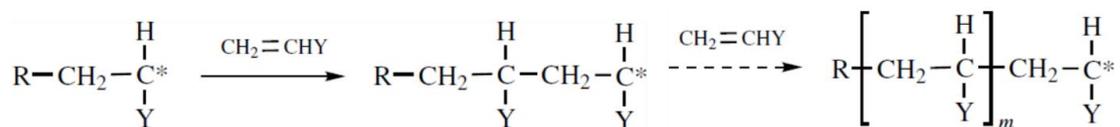
R* par voie thermique, photochimique ou électrochimique.



Cette espèce réactive, qui peut être un radical libre, un cation ou un anion, est couplée à un monomère en ouvrant la liaison π en vue de former un nouveau radical, cation ou anion alors dénommé « primaire ».



- Propagation : le processus se répète par ajout successif d'autres monomères au centre réactif augmentant ainsi la longueur de la chaîne.



- Terminaison : la terminaison des chaînes en croissance est effectuée par réaction de couplage ou dismutation entre deux centres réactifs pour obtenir des macromolécules sans radical (Hamaide, *et al.*, 2014 ; Odian, 2004).

Les polymères sont donc constitués de macromolécules formées par l'enchaînement d'unités monomères. Dans le cas des copolymères et terpolymères, il s'agit de 2 ou 3 monomères de nature chimique différente.

b) Principe de l'impression moléculaire

Les polymères à empreintes moléculaires (MIPs) sont des matériaux synthétiques qualifiés de composés biomimétiques. Ils possèdent des propriétés de reconnaissance moléculaire similaires à celles des récepteurs naturels tels que les enzymes ou les anticorps. Ces propriétés sont obtenues par copolymérisation de monomères fonctionnels en présence d'une molécule cible ou éventuellement d'un analogue structural, permettant de générer dans la matrice polymérique des cavités complémentaires, en termes de taille et de fonctionnalité chimique, à la molécule d'intérêt. Outre la présence du monomère fonctionnel et de la molécule d'intérêt, la synthèse de MIPs nécessite un solvant porogène, un agent réticulant et un initiateur. Après élimination de la molécule cible ou de l'analogue dans les MIPs ainsi formés, les cavités formées peuvent fixer spécifiquement et de manière réversible la molécule étudiée. Le principe de l'impression moléculaire est représenté en figure 1.1

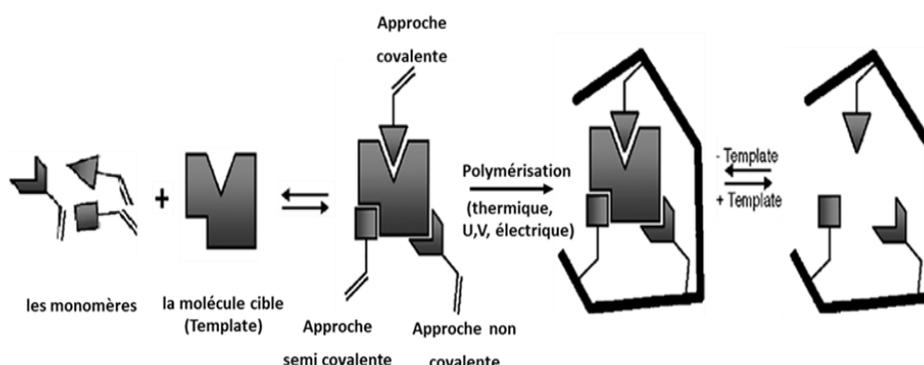


Figure 1.1. Principe de l'impression moléculaire (Sellergren & Allender, 2005).

Un polymère non imprimé, appelé NIP, est généralement synthétisé dans les mêmes conditions que le MIP mais en absence de la molécule cible.

c) Historique

La reconnaissance moléculaire a été reconnue comme un ensemble de phénomènes primordiaux dans les systèmes biologiques. Ce terme fait référence à une interaction spécifique entre deux ou plusieurs molécules au sein d'un mécanisme donné comme les interactions récepteur-ligand, enzyme-substrat ou encore antigène-anticorps (Gellman, 1997).

Chapitre 1 : Etude bibliographique

En effet, la capacité d'une entité biologique à fixer une molécule de manière spécifique et sélective a attiré les chercheurs de divers horizons scientifiques. Un grand nombre de recherches ont été menées depuis des dizaines d'années afin de concevoir des systèmes de reconnaissance moléculaire artificiels pour des applications diverses, notamment en chimie analytique.

En 1931, le groupe de Polyakov a été le premier à observer un comportement d'adsorption inhabituel des particules de gel de silice qu'il avait synthétisées en présence de solvants additionnels : benzène, toluène ou xylène. Ces gels de silice étaient par la suite capables de capter fortement chacun de ces trois solvants (Polyakov, 1931).

Au début des années 70, les équipes de Klotz et de Wulff ont publié des travaux sur la synthèse de polymères organiques basés sur un complexe covalent entre molécule cible et monomère fonctionnel. A titre d'exemple, Klotz et Takagishi ont synthétisé pour un polymère d'éthylène imine pour le methyl orange et ont observé que la molécule cible formait des ponts disulfures avec le polymère (Takagishi & Klotz, 1972). A la même époque, Wulff et Sarhan ont décrit la synthèse d'un polymère pour l'acide D-glycérique (Wulff, 1973).

Dans les années 80, le groupe de Mosbach a expliqué spécifiquement toutes les autres possibilités de formation d'un complexe molécule cible / monomère fonctionnel, à partir de liaisons ioniques ou de liaisons faibles de type liaison hydrogène et forces Van der Waals (Arshady & Mosbach, 1981a).

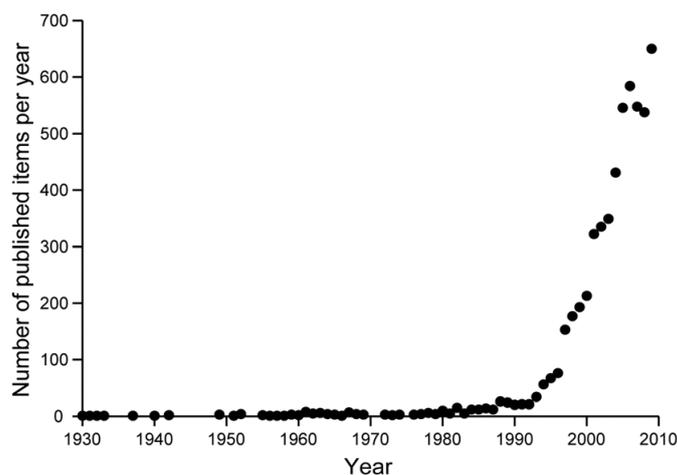


Figure 1.2. Evolution du nombre de publications sur les MIPs (Whitcombe et al., 2014).

Cependant, ce n'est à partir des années 1990 que les recherches se sont accrues dans le domaine (des polymères à empreintes moléculaires) comme le montre la figure 1.2.

d) Applications

De nos jours, des polymères à empreintes moléculaires ont été synthétisés pour des molécules cibles très diverses comme des acides aminés (Vidyasankar *et al.*, 1997), des médicaments (Çetin & Denizli, 2015), des métabolites (Baydemir *et al.*, 2009), des herbicides (Bastide *et al.*, 2005), des insecticides (Bakas *et al.*, 2013a), des protéines (Zayats *et al.*, 2014) etc.

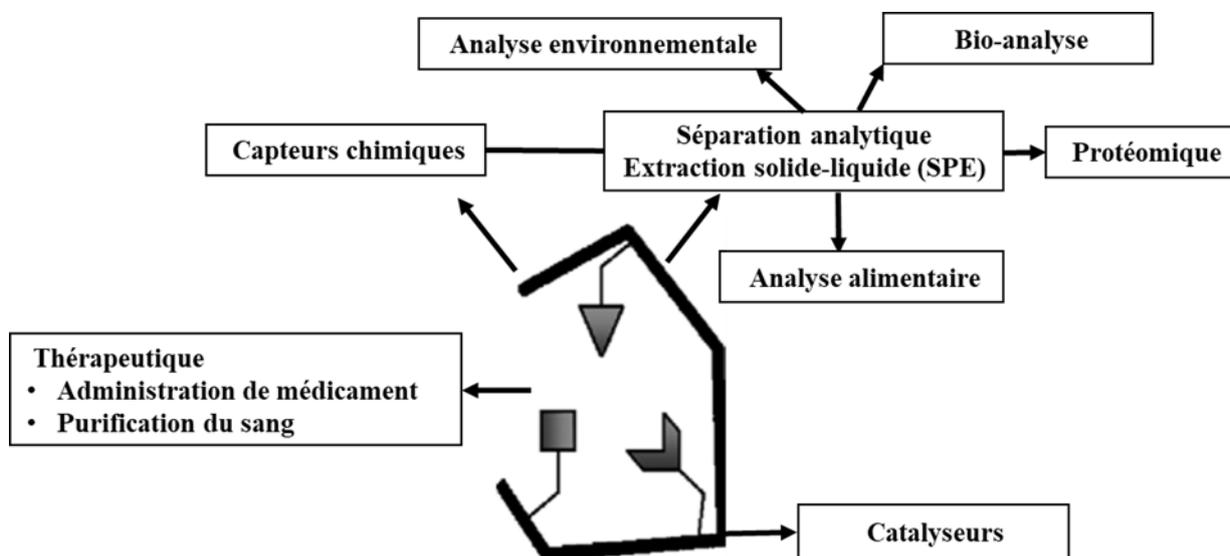


Figure 1.3. Utilisation des polymères à empreintes moléculaires, (adapté de Sellergren & Allender, 2005).

Cette diversité de molécules à imprimer, ainsi que la stabilité et la facilité de synthèse de MIPs, permettent d'envisager ces polymères comme récepteurs artificiels énormément intéressants pour diverses applications résumées dans la figure 1.3 et présentées dans les 3 sous-parties suivantes.

d.1) MIPs comme catalyseurs pour synthèses sélectives

Dès la découverte des MIPs, leurs cavités ont été utilisées afin de réaliser des réactions sélectives. Bien que l'on ne puisse qualifier les MIPs de catalyseurs au sens strict du terme,

Chapitre 1 : Etude bibliographique

L'objectif consiste ici en leur utilisation comme microréacteurs pour les réactions regio- et stéréo sélectives. Pour ce faire, la molécule empreinte choisie pour synthétiser le MIP doit correspondre au produit de la réaction que l'on souhaite favoriser. Ainsi les MIPs peuvent donc être utilisés dans différents types de réactions chimiques pour favoriser la synthèse sélective d'énantiomères. A titre d'exemple, le groupe de Wulff a synthétisé une cavité chirale pour préparer un composé optiquement actif d'acide aminé à partir de glycine. L'excès énantiomérique obtenu (36%) représente la meilleure énantiosélectivité rapportée avec des polymères imprimés (Wulff, 2002).

Par ailleurs, le groupe de Shea a synthétisé un MIP permettant de catalyser la réaction de déhydrofluorination du 4-fluoro-4-(p-nitrophényl) butan -2-one selon la réaction suivante.

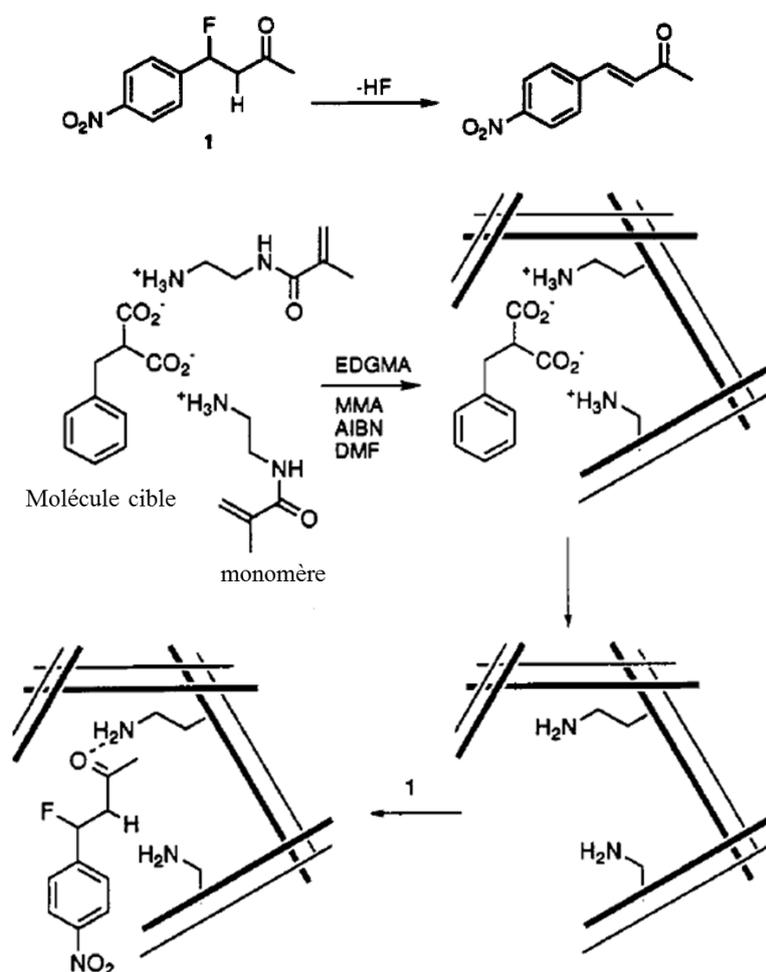


Figure 1.4. Design d'un catalyseur pour la déhydrohalogénéation (Beach & Shea, 1994).

Le schéma de synthèse est présenté dans la figure 1.4. La molécule cible d'acide benzyle malonique a été utilisée comme molécule empreinte pour orienter le monomère N-(2-amine éthyle)-méthacrylamide avant la polymérisation. Les MIPs ainsi obtenus ont conduit à une

constante de vitesse de déhydrofluorination, calculée selon une cinétique de pseudo premier ordre, 3,2 fois plus importante que pour le contrôle sans MIP (Beach & Shea, 1994).

Si on compare les MIPs à leurs homologues biologiques, les enzymes, ils présentent de nombreux avantages dus à une meilleure stabilité et résistance aux conditions physico-chimiques de réaction : température élevée, haute pression, présence de différents solvants organiques et milieu acide ou basique etc (Vasapollo *et al.*, 2011).

d.2) Utilisation des MIPs en chimie analytique :

Les MIPs ont été largement utilisés dans le domaine analytique, soit pour l'extraction sur phase solide, soit pour la conception de capteurs chimiques.

Sciences séparatives :

Les MIPs peuvent être utilisés pour séparer spécifiquement une molécule cible d'autres analogues ou dérivés ou encore pour extraire la molécule cible présente dans une matrice complexe, organique ou aqueuse, en utilisant une seule étape d'extraction. Ces MIPs peuvent ainsi constituer la phase stationnaire d'une colonne d'HPLC (Haginaka, 2008) ou bien être incorporés dans une cartouche de type SPE. Cette dernière technique appelée MISPE (Molecularly Imprinted Solid Phase Extraction) a notamment été utilisée pour l'extraction du diméthoate dans l'huile d'olive (Bakas *et al.*, 2013b) ou encore l'extraction de barbiturates dans l'urine humaine (Beltran *et al.*, 2011). Ce type d'extraction utilisant des MIPs comme support séparatif s'avère plus sélectif que les méthodes d'extraction classiques (Vasapollo *et al.*, 2011).

Capteurs électrochimiques :

L'idée d'utiliser les MIPs au sein de capteurs chimiques est née de leur comparaison avec les biocapteurs. En effet, Les biocapteurs sont des outils analytiques constitués d'un élément de reconnaissance biologique, comme un anticorps, couplé à un transducteur qui transforme le signal physico-chimique issu de leur interaction en un signal mesurable. Ils ont été largement décrits dans la bibliographie mais souffrent généralement d'une stabilité chimique et physique limitée. Compte tenu de leurs propriétés de reconnaissance moléculaire et de leur stabilité, les polymères à empreintes moléculaires ont alors été envisagés comme éléments de reconnaissance synthétiques, et ont conduit à la formation de capteurs appelés capteurs biomimétiques (Haupt & Mosbach, 1998).

A titre d'exemple, en utilisant la voltammétrie à vague carrée (SWV), une électrode à pâte de carbone modifiée par des MIPs de prométhazine a permis de déterminer la présence de cette molécule électroactive dans du plasma. Cette méthode permet d'extraire, de pré-concentrer et de détecter la prométhazine en une seule étape (Alizadeh & Akhoundian, 2010).

d.3) Usage des MIPs en thérapeutique

La grande capacité des MIPs à se lier avec des molécules cibles permet leur utilisation dans le domaine médical et plus particulièrement en ce qui concerne l'administration de médicaments et l'élimination de substances toxiques du corps humain.

Pour utiliser les MIPs comme transporteurs de médicament ou adsorbants d'une molécule toxique, les caractérisations spécifiques suivantes sont nécessaires :

Les MIPs doivent être stables et conserver la même structure tridimensionnelle en absence de la molécule cible tout en facilitant l'entrée et l'évacuation de cette dernière dans la cavité. Les MIPs doivent également résister aux attaques enzymatiques et chimiques et au stress mécanique provoqué par les fluides biologiques (Vasapollo *et al.*, 2011).

Dans certains cas, les MIPs peuvent agir comme des agents libérateurs intelligents, c'est-à-dire qu'ils libèrent un médicament suite à des stimuli spécifiques, comme la présence d'une autre molécule par exemple. En 1999, Sreenivasan a montré que la libération de testostérone incorporée dans un MIP était favorisée en présence d'hydrocortisone dans le milieu. Dans cette étude, trois étapes ont été nécessaires pour attester ce mécanisme : la première étape a consisté en l'utilisation de l'hydrocortisone comme molécule empreinte permettant la synthèse du MIP ; la deuxième étape en un lavage visant à éliminer cette molécule ; la troisième étape en une incorporation dans le MIP de la testostérone, molécule ayant une structure proche de celle de la molécule empreinte. Les résultats de l'étude montrent que le taux de libération de la testostérone augmente en présence d'hydrocortisone dans la solution (Sreenivasan, 1999).

Les polymères à empreinte moléculaire sont des matériaux prometteurs dans l'administration de médicaments car ils permettent une libération prolongée du principe actif contrairement aux modes d'administration classiques. Ils peuvent être envisagés pour une administration par voie oculaire, cutanée, intraveineuse ou orale. Cette nouvelle classe de

Chapitre 1 : Etude bibliographique

matériaux innovants s'avère presque indispensable dans la pharmacothérapie moderne. Cependant, ils ne trouvent pas d'application répandue dans le domaine médical compte tenu des fortes contraintes réglementaires. A ce jour, il n'existe d'ailleurs aucune publication relatant d'études cliniques utilisant des MIPs comme nouveaux dispositifs d'administration de médicaments. Afin de faciliter la mise en place de nouvelles formes imprimées de délivrance de médicaments en pharmacothérapie, les tests de cytotoxicité, la compatibilité à long terme et les performances cliniques des MIPs devraient faire l'objet de futures études scientifiques leur permettant de répondre aux normes sanitaires.

Dans de telles études, les aspects économiques et réglementaires, ainsi que des études cliniques, peuvent être un obstacle majeur à la commercialisation des médicaments. Certains des problèmes susmentionnés pourraient être surmontés si les scientifiques étaient davantage impliqués dans la recherche sur les polymères imprimés (Luliński, 2017).

Les MIPs peuvent être utilisés pour piéger spécifiquement une substance indésirable dans le corps d'un être vivant, et plus spécifiquement dans les fluides gastro-intestinaux ou dans le sang. Ils peuvent donc bloquer leur absorption dans le corps et limiter ainsi leurs nocifs.

Le groupe de Sellergren a synthétisé des MIPs pour adsorber spécifiquement du cholestérol. Les essais ont été réalisés en utilisant une solution mimant le fluide gastrique. Les résultats de l'étude démontrent que le MIP a adsorbé 17 mg de cholestérol par gramme de polymère sec tandis que le polymère non-imprimé en a adsorbé environ 13 mg.g⁻¹. Ainsi, les polymères imprimés ont montré une capacité d'adsorption maximale plus importante que celle d'autres adsorbants (Sellergren *et al.*, 1998).

En 2010, l'équipe de Hoshino a synthétisé des nanoparticules de polymères imprimés (MIPNP) capables de capturer efficacement le peptide méltine cytotoxique dans le sang de souris vivantes. L'affinité forte et spécifique des nanoparticules imprimées a permis la séquestration rapide du peptide cible dans le milieu biologique. Les complexes de méltine-MIPNP sont ensuite éliminés du sang par le système phagocytaire monoculaire vers le foie. En raison de la fixation de la méltine par les MIPNP *in vivo* et de son élimination, la mortalité et les symptômes toxiques périphériques de la méltine ont été significativement diminués (Hoshino *et al.*, 2010).

1.1.2. Synthèse des polymères à empreintes moléculaires

Chaque synthèse de polymères à empreintes moléculaires nécessite des réactifs de polymérisation. Le choix de ces réactifs, la nature de leur interaction et la méthode de polymérisation jouent un rôle très important dans l'obtention des cavités spécifiques aux MIPs.

La synthèse des MIPs est obtenue par polymérisation et nécessite la présence des réactifs suivants :

- monomères fonctionnels (MF)
- Initiateur
- solvant porogène
- agent réticulant
- molécule empreinte.

La procédure de synthèse des MIP comporte trois étapes essentielles :

1^{ère} étape : les monomères sont des composés polymérisables ayant des affinités chimiques présumées avec la molécule empreinte et qui subissent un pré arrangement en présence de cette molécule dans un solvant porogène. Le complexe formé entre la molécule cible et le monomère est appelé le complexe de pré-polymérisation (CPP).

2^{ème} étape : elle consiste à co-polymériser un agent réticulant qui constituera l'ossature des MIPs en présence d'un initiateur qui accélère la réaction par voie thermique (Bakas *et al.*, 2012), photochimique (U.V.) (Bastide *et al.*, 2005) ou électrochimique (Özcan *et al.*, 2008).

3^{ème} étape : cette étape correspond à l'extraction de la molécule cible au sein du polymère ainsi qu'à l'élimination du solvant porogène et des réactifs non polymérisés.

Enfin, le polymère ainsi obtenu contient des cavités dont la forme est prédéfinie pour la reconnaissance sélective de la molécule cible.

Dans la synthèse de MIPs, l'étape déterminante concerne la formation du complexe de pré-polymérisation (CPP) car elle conditionne la qualité des sites de reconnaissance. Dans les parties suivantes, sont présentées les différentes approches possibles.

a) Différentes approches pour la formation du complexe de pré-polymérisation

Selon la nature des interactions entre les monomères fonctionnels et les molécules empreintes dans le complexe de pré-polymérisation, trois approches différentes d'impression existent : l'approche covalente, l'approche semi-covalente et l'approche non-covalente.

a.1) Approche covalente

L'approche covalente a été développée en 1973 par le groupe de G.Wulff (Wulff *et al.*, 1973).

Le principe de cette technique est le suivant : la molécule empreinte est liée de manière covalente à un ou plusieurs monomère(s) fonctionnel(s) (MF). Ensuite, ce complexe est polymérisé avec un agent réticulant puis la molécule empreinte doit être extraite par rupture de la liaison covalente formée au sein du réseau polymérique. Enfin, la fixation de la molécule cible dans les cavités se fait également par des liaisons covalentes (Alexander *et al.*, 2006 ; Zhang *et al.*, 2006). Plusieurs exemples présentant les possibilités de former un complexe entre la molécule empreinte et le monomère fonctionnel sont résumés dans le tableau (1.1).

Tableau 1.1. Fonctions caractéristiques de la molécule cible, du monomère fonctionnel et du complexe formé lors d'approches covalentes.

Fonction de la molécule empreinte	Fonction du monomère fonctionnel	Complexe formé	référence
Aldéhyde	Amine	Base de schiff (imine)	(Wulff <i>et al.</i> , 1982) (Wulff & Vietmeier, 1989a)
Amine	Aldéhyde	Base de schiff (imine)	(Wulff <i>et al.</i> , 1984)
Mono ou di Cétones	Diols	Acétals ou cétals	(Shea & Dougherty, 1986)
Mono ou di Carbonyle	Diols	Acétals ou cétals	(Wulff & Wolf, 1986)
Hydroxyle groupe Diols Sucre Acide D-glycerique α -acide aminé	Acide Boronique	Ester Boronique	(Wulff <i>et al.</i> , 1980) (Wulff & Haarer, 1991) (Wulff <i>et al.</i> , 1977) (Sarhan, 1982) (Wulff & Vietmeier, 1989a) (Wulff & Vietmeier, 1989b)

Avantages

- ✓ Interaction précise entre le monomère fonctionnel et la molécule cible.
- ✓ Nombre de sites de reconnaissance obtenus dépendant de la quantité de monomères fonctionnels utilisés.
- ✓ Sites de reconnaissance toujours situés à l'intérieur de la cavité (Wulff, 2002).

Inconvénients

- Possibilité de modifier des sites de reconnaissance pendant l'étape de lavage (Wulff, 2002).
- Molécules cibles limitées à des alcools, amines, acides carboxyliques et aldéhydes.

a.2) Approche semi-covalente

Le principe de cette technique réside dans la formation d'une liaison covalente entre la molécule empreinte et le monomère dans le complexe de pré-polymérisation. Après synthèse du MIP et extraction de la molécule empreinte par rupture de liaison covalente, la molécule cible sera liée aux sites d'interactions du MIP par des liaisons non-covalentes de type hydrogènes, par exemple. Dans ce type d'approche, la molécule empreinte utilisée pour la synthèse des MIPs est une molécule différente de la molécule cible.

En 1973, le groupe de Wulff a été le premier à avoir eu l'idée d'utiliser l'approche semi-covalente pour synthétiser un MIP afin de détecter l'acide glycérique. Cette approche a d'abord nécessité la synthèse d'un complexe de pré-polymérisation (Acide D-glycérique (p-vinylaniline)-2,3-O-(p-vinylphénylboronate) (figure 1.5 a).

Le MIP a ensuite été synthétisé grâce à une initiation radicalaire par l'azobisisobutyronitrile par l'ajout d'une quantité élevée d'agents réticulants (divinylbenzène et éthylvinylbenzène) dans de l'acétonitrile. Après l'étape de lavage, Wulff et son équipe ont constaté la présence de deux groupes libres au sein d'une des cavités du polymère obtenu : un groupe d'acide boronique et un groupe amine. Le polymère obtenu a montré une capacité d'adsorption de l'acide glycérique en liaison avec les deux groupes libres susmentionnés et selon deux voies : la voie covalente impactant le groupe d'acide boronique via une liaison diester et la voie non-covalente impactant le groupe d'amino du 4-vinylaniline via une liaison électrostatique (figure 1.5 b) (Wulff *et al.*, 1973).

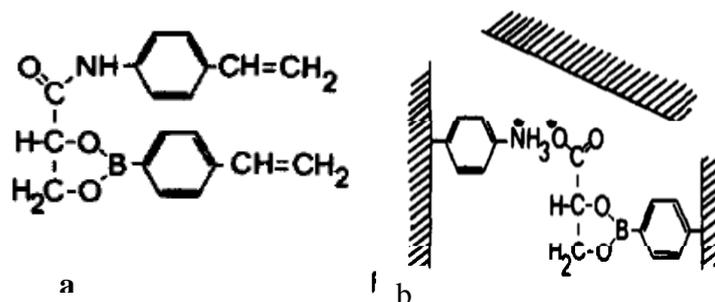


Figure 1.5. Approche semi-covalente lors de l'impression moléculaire de l'acide glycolique
(d'après Wulff *et al.*, 1973).

En 1990, Sellergren fut le pionnier de la mise en application de l'approche semi-covalente avec pour objectif la préparation des MIPs pour une reconnaissance de l'ester éthylique de la L-p-aminophénylalanine (L-p-NH₂PheOEt), molécule cible.

Cette approche a consisté en la synthèse d'un complexe de pré-polymérisation, le N²-propionyl-O¹-acryloyl-L-2-amino-3-(O⁴-acryloyl-4-hydroxyphenyl)-1-propanol (composé 1, figure 1.6). Cette synthèse a été réalisée par le biais d'une liaison covalente de type ester entre le L-2 amino-3-(4-hydroxyphenyl)-1-propanol (molécule empreinte, analogue de la molécule cible, composé 2 figure 1.6) et le chlorure d'acryloyle (monomère fonctionnel, composé 3 figure 1.6). Ensuite, le complexe a été co-polymérisé avec un excès de divinylbenzène (DVB) en présence d'acétonitrile. Enfin, l'étape de lavage a permis l'hydrolyse de la liaison ester au sein du polymère permettant une libération des groupements d'acides carboxyliques et rendant ainsi possible une capture de molécule cible, l'ester L-p-aminophénylalanine d'éthyle, par le biais de liaisons hydrogènes et électrostatiques (figure 1.6) (Sellergren, 1990).

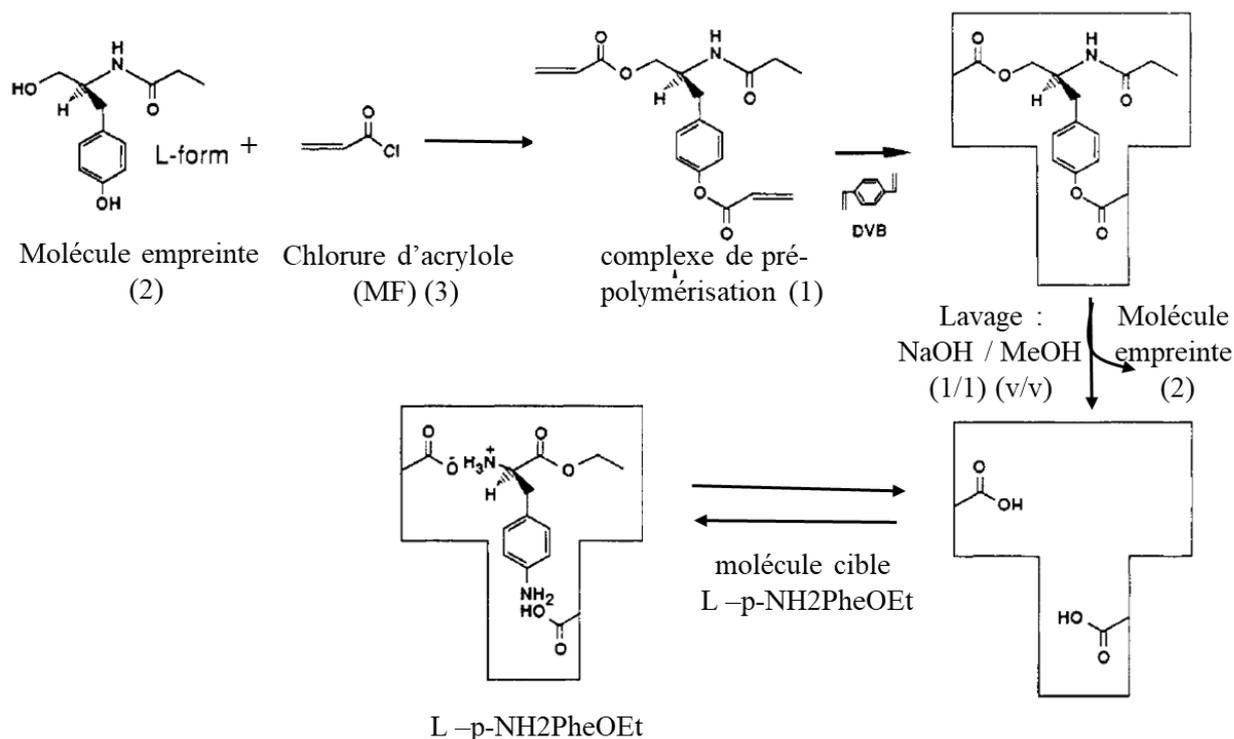


Figure 1.6. Approche semi-covalente pour l'impression moléculaire de l'ester L-p-aminophénylalanine d'éthyle (d'après Sellergren, 1990).

En 1995, Whitcombe *et al.* ont exploré une autre voie de synthèse lors de laquelle le monomère fonctionnel est lié à la molécule empreinte par l'ajout d'un espaceur. Lors de l'étape de lavage, la molécule empreinte et l'espaceur vont être éliminés. Enfin, le polymère imprimé reconnaît la molécule cible par voie non-covalente. Dans cette étude, un MIP spécifique au cholestérol (molécule cible) a été réalisé via la synthèse de carbonate de cholesteryl (4-vinyl) phenyl; composé (1) de la figure 1.7. Après copolymérisation avec l'EGDMA (agent réticulant) en présence de l'AIBN (initiateur), l'étape de lavage a été effectuée avec du NaOH dans du méthanol pour libérer simultanément la molécule empreinte (cholestérol) et l'espaceur (CO₂). Enfin, le cholestérol a pu être lié par voie non-covalente dans le site de reconnaissance du MIP (Whitcombe *et al.*, 1995).

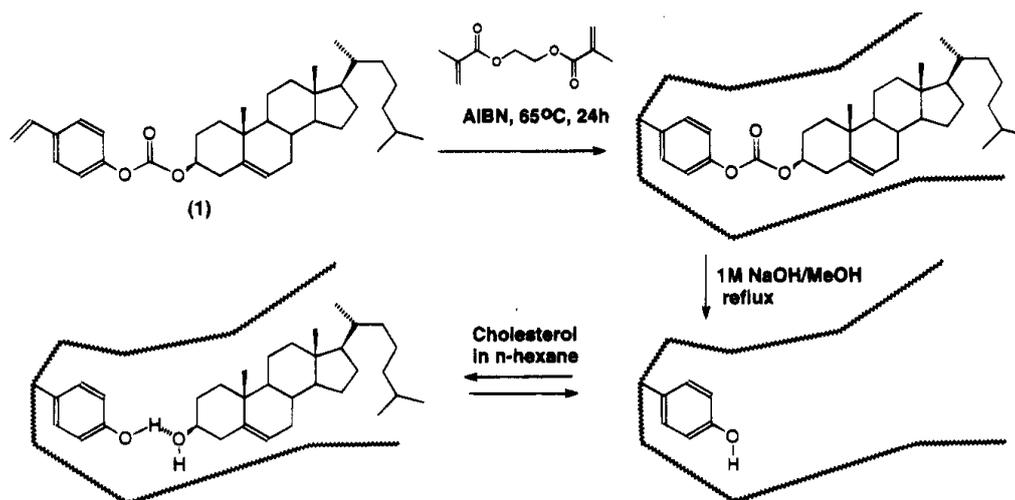


Figure 1.7. Schéma de l'impression moléculaire du cholestérol par voie semi-covalente, composé (1) : carbonate de cholestérol (4- vinyl)phényl (adapté de Whitcombe *et al.*, 1995).

Avantages

- ✓ Sites de reconnaissance non spécifiques moins importants dans la matrice polymérique.
- ✓ Sites de reconnaissance plus homogènes et plus spécifiques. (Lok & Son, 2009).

Inconvénients

- Difficulté de clivage des molécules cibles (Batra & Shea, 2003).

a.3) Approche non-covalente

Cette technique a été développée en 1981 par le groupe de Mosbach (Arshady & Mosbach, 1981b).

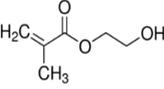
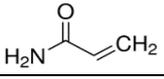
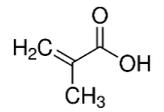
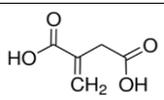
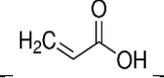
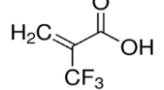
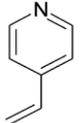
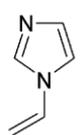
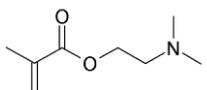
Le principe de cette technique est basé sur l'auto-assemblage du monomère fonctionnel et de la molécule empreinte d'une manière non covalente pour former le complexe de pré-polymérisation. Ce dernier, en présence d'un initiateur, est fixé dans l'espace par co-polymérisation avec un agent réticulant afin d'obtenir des MIPs. Après la polymérisation, une étape de lavage est nécessaire pour extraire la molécule empreinte. Au final, le MIP reconnaît la molécule cible par interaction non covalente (Yan & Ho Row, 2006).

Les interactions impliquées dans l'auto assemblage avant et pendant la polymérisation sont les interactions électrostatiques de type dipôle-dipôle, des liaisons hydrogènes... (Alexander *et al.*, 2006).

Chapitre 1 : Etude bibliographique

Les monomères possèdent des groupements fonctionnalisés capables de réagir avec la molécule empreinte de manière non covalente. Ils peuvent être classés selon leur nature en trois catégories présentées dans le tableau 1.2 :

Tableau 1.2. Structure des principaux monomères fonctionnels.

Catégorie	Nom	Structure	Référence
Monomères neutres	2-Hydroxy Ethyl Méthacrylate (HEMA)		(Kugimiya & Takeuchi, 2002)
	Acrylamide (AA)		(Bunte <i>et al.</i> , 2007)
Monomères acides	Acide méthacrylique (MAA)		(Spivak <i>et al.</i> , 1997) (Spivak & Shea, 1998)
	Acide Itaconique		(Huang <i>et al.</i> , 2011)
	Acide Acrylique		(Feás <i>et al.</i> , 2009)
	Acide 2- (trifluoro méthyl acrylique)		(Matsui <i>et al.</i> , 1997)
Monomères basiques	4-Vinyl Pyridine (4-VP)		(Breton <i>et al.</i> , 2009)
	1-Vinyl imidazole (VI)		(Sanbe & Haginaka, 2002) (Matsui <i>et al.</i> , 1997)
	2-(DiMéthylAmino) Ethyle Méthacrylate (DMAEM)		

Le monomère le plus utilisé par les chercheurs pour cette approche est l'acide méthacrylique (MAA). Sa nature (acide, neutre ou basique) peut varier selon le pH du milieu.

En tant que monomère neutre, il a la faculté d'effectuer des liaisons hydrogènes avec la molécule cible neutre. A titre d'exemple, un MIP a été synthétisé à partir du β -estradiol (molécule empreinte), du MAA (monomère fonctionnel) et du di-méthacrylate d'éthylène glycol (EGDMA – agent de réticulation). Ce MIP a montré une capacité de reconnaissance sélective pour 5 stéroïdes (β -Estradiol, Ethinylestrodiol, Estradiol benzoate, Testostérone et

Chapitre 1 : Etude bibliographique

méthyl testostérone) en formant des liaisons hydrogènes entre le groupe OH situé dans les cinq stéroïdes et le groupe COOH du MAA (Dong *et al.*, 2003).

En tant que monomère acide ou basique, il a la faculté de former des paires d'ions avec les molécules cibles acides ou basiques. Dans ce cas précis et afin d'obtenir une sélectivité maximale des MIPs, la valeur du pH du solvant à percoler doit être proche de la valeur pKa de la molécule empreinte (Sellergren & Shea, 1993a).

A titre d'exemple, l'étude de Luliński a montré la capacité du MAA à jouer un rôle acide en séparant la dopamine dans l'urine. Sept MIPs ont été synthétisés à partir de sept MF (allylamine, 4-vinylpyridine, 2-phénylpropène, acide 4-vinylbenzoïque, acide itaconique, acide acrylique, acide méthacrylique), du 4-(2-aminoéthyl) aniline (molécule empreinte) et de l'éthylène glycol di-méthacrylate (agent de réticulation). Les résultats des tests d'adsorption ont montré que le MIP synthétisé à partir du MAA présentait la spécificité de liaison la plus élevée envers la dopamine (Luliński *et al.*, 2014).

Par ailleurs, l'étude de Zaidi a montré la capacité du MAA à jouer un rôle basique en synthétisant des colonnes de MIPs OT-CEC (Open Tubular Molecule Imprinted Polymer Capillary Columns) avec onze médicaments ayant des groupes acides (ibuprofène, fénoprofène, naproxène, kétoprofène, flurbiprofène, 3-BOCd), ofloxacine, acide mandélique, acide méthyl succinique, acide 2-phényle butyrique, camphre). Cette synthèse de colonnes de MIPs OT-CEC a démontré une excellente efficacité de séparation chirale des énantiomères matriciels et de séparation non-chirale d'alkylbenzènes et de solutés polaires. Bien que le pH et la composition de l'éluant différaient selon le choix des onze médicaments, il a été découvert qu'un seul et même éluant pouvait être utilisé pour plusieurs colonnes de MIPs OT-CEC et sans que l'efficacité de la séparation chirale en soit amoindrie (Zaidi *et al.*, 2010).

Avantages

- ✓ Préparation de l'approche non-covalente très simple, synthèse chimique facile.
- ✓ Applicable pour une large gamme des molécules cibles.
- ✓ Grand nombre de monomères fonctionnels commercialement disponibles (Zhang *et al.*, 2006).

Inconvénients

- MIPs moins homogènes que ceux synthétisés par l'approche covalente (Zhang *et al.*, 2006).

- Importante quantité de monomères fonctionnels nécessaire pour augmenter les chances d'interaction avec la molécule cible pouvant conduire à un MIP créant un grand nombre d'interactions non spécifiques avec la molécule empreinte (Alexander *et al.*, 2006).

En conclusion, la voie non-covalente est la plupart du temps la voie privilégiée pour les raisons suivantes : simplicité de la synthèse chimique, large choix de molécules cibles et importante disponibilité commerciale de monomères fonctionnels.

b) Acteur de polymérisation

Dans cette partie, nous décrivons l'influence des réactifs et de paramètres physico-chimiques sur la synthèse de MIPs.

b.1) Molécule empreinte

La molécule empreinte joue un rôle important pour orienter les groupements fonctionnels autour d'elle pendant toute la période de synthèse des MIPs.

Les molécules empreintes peuvent être classées en trois catégories selon la classification de Sellergren (Sellergren, 1999) :

- Catégorie 1 : Molécules faiblement à modérément polaires interagissant généralement avec le monomère MAA par liaison hydrogène.
- Catégorie 2 : Acides ou bases de Bronsted démontrant une bonne affinité avec les monomères acides comme le MAA ou basiques comme le 2-VP par un mécanisme d'échange de proton d'ions.
- Catégorie 3 : Molécules ayant des caractères hydrophobes. La rétention de ces molécules au sein des MIPs est favorisée lorsque la phase mobile est riche en eau.

Les molécules empreintes doivent présenter les caractères suivants :

- Etre inertes vis-à-vis des conditions de polymérisation comme la chaleur ou les rayonnements U.V.
- Sans interaction avec le mécanisme réactionnel et sans inhibition du monomère fonctionnel.
- Sans effet sur le rendement de la polymérisation et les propriétés des sites de reconnaissance dans le MIPs (Yilmaz *et al.*, 1999 ; Yan & Ho Row, 2006).

Pendant l'étape de polymérisation, si la molécule cible est victime d'une dénaturation, il est alors nécessaire d'utiliser une molécule empreinte analogue. Pendant l'étape de lavage, plusieurs problèmes peuvent survenir tels que la déformation des points de liaison, l'effondrement ou la rupture de la cavité ou l'inaccomplissement du lavage présentés dans la figure 1.8.

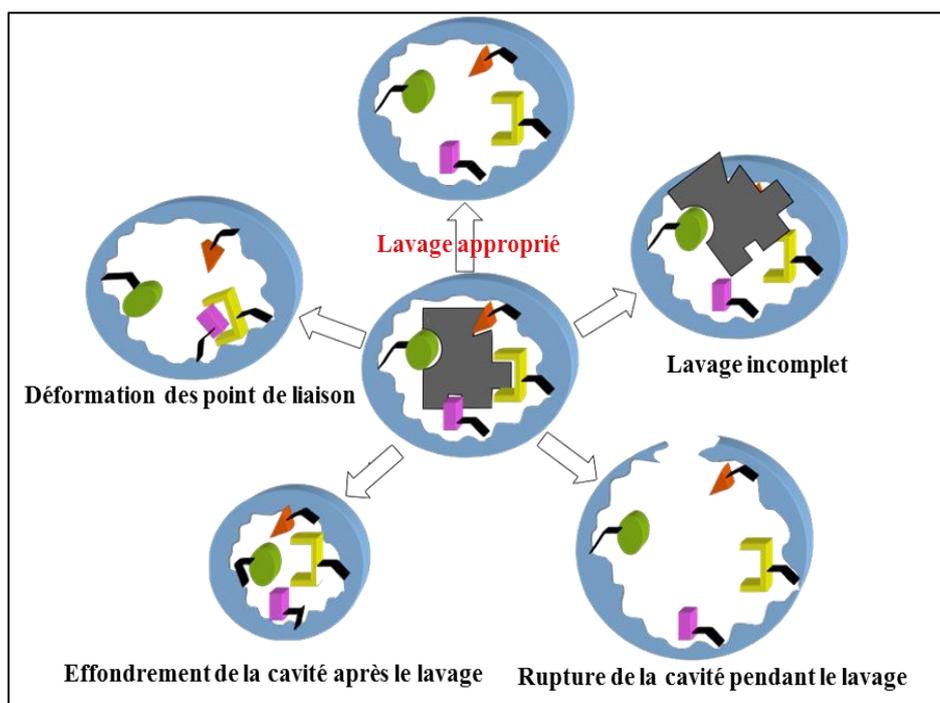


Figure 1.8. Schéma du changement de forme d'un MIP pendant la période de lavage

(d'après Lorenzo *et al.*, 2011).

A l'issue de l'étape de lavage, si la molécule empreinte demeure à l'intérieur de la cavité, d'inévitables erreurs de dosage auront lieu pendant l'étape d'extraction. C'est pour cette raison qu'une impression moléculaire avec une molécule aux caractéristiques très proches (taille, forme, stéréochimie, groupes fonctionnels analogues) est très souvent préférée (Lorenzo *et al.*, 2011 ; Tabassi *et al.*, 2013).

b.2) Monomère fonctionnel

Le choix du (des) monomère(s) fonctionnel(s) est essentiel pour obtenir un MIP constitué de cavités ayant une bonne affinité pour la molécule cible.

Chapitre 1 : Etude bibliographique

Les facteurs influençant la formation des sites de liaisons entre la molécule empreinte et le monomère fonctionnel sont présentés dans la figure suivante :

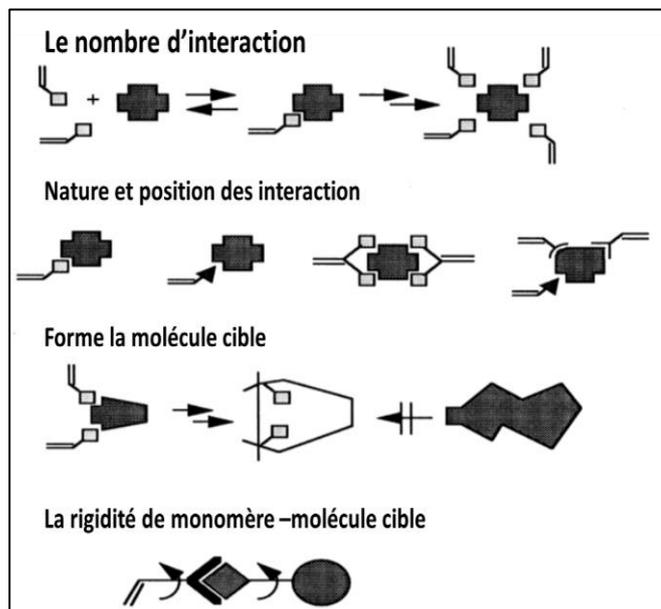


Figure 1.9. Facteurs influençant la formation de la liaison entre les sites de reconnaissance et les molécules empreintes (Sellergren, 1999).

Il est très important de sélectionner le monomère fonctionnel ayant la meilleure interaction avec la molécule empreinte car la qualité et les propriétés des sites de reconnaissance du MIP dépendront de la force d'interaction entre le monomère fonctionnel et la molécule empreinte (Andersson *et al.*, 1999). Différentes techniques comme la spectroscopie U.V.-VIS (Fu *et al.*, 2015) ou infra-rouge FTIR (Fu *et al.*, 2015 ; Oral & Peppas, 2004), la RMN (Zhu *et al.*, 2002), ou encore la simulation informatique (Piletsky *et al.*, 2001a) ont été développées pour caractériser ces interactions.

Par ailleurs, Yilmaz et ses collaborateurs (Yilmaz *et al.*, 1999) ont étudié l'influence de la proportion du monomère fonctionnel dans le mélange monomère fonctionnel/molécule empreinte sur la capacité de rétention des MIPs correspondants. Les résultats de cette étude montrent que les proportions très importantes de monomères fonctionnels conduisent à une augmentation des interactions non spécifiques. A ce jour, le ratio monomère fonctionnel/molécule empreinte de 4/1 est le plus utilisé dans le cas d'une interaction non covalente et conduit souvent à une meilleure spécificité du MIP par rapport au NIP (Yilmaz *et al.*, 1999 ; Cormack & Elorza, 2004).

Chapitre 1 : Etude bibliographique

Dans un certain nombre de cas, des polymères ont été synthétisés en combinant plusieurs types de monomères fonctionnels. Ces polymères possèdent des capacités de reconnaissance bien meilleures que celles observées en utilisant les copolymères correspondants (Ramstroem *et al.*, 1993 ; Tunc *et al.*, 2006). Ces systèmes sont particulièrement complexes et une association monomère-monomère sera en concurrence avec une association monomère-molécule empreinte si aucun des monomères n'a de préférence particulière pour la molécule empreinte. Les différentes études menées indiquent qu'une reconnaissance adéquate ne peut être obtenue qu'avec une approche d'optimisation combinatoire (Sellergren, 1999).

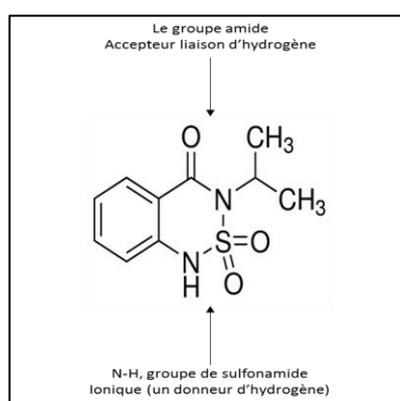


Figure 1.10. Structure de la bentazone, molécule cible présentant 2 sites de reconnaissance (Baggiani *et al.*, 1999).

Dans le cas de molécules empreintes possédant plusieurs groupements fonctionnels, la synthèse de MIPs peut être réalisée à partir d'une combinaison de plusieurs monomères fonctionnels. Par exemple, le bentazone, qui possède un groupement sulfonamide et un groupement amide (figure 1.10), a pu développer une liaison ionique avec le monomère 4-VP et une liaison hydrogène avec le monomère MAA. Des MIPs ont été préparés avec la même quantité de bentazone et différentes quantités de 4-VP et MAA. Les résultats montrent une meilleure sélectivité du MIP résultant d'un mélange équimolaire de 4-VP et MAA et une capacité de rétention supérieure des MIPs synthétisés avec d'autres ratios de monomères (Baggiani *et al.*, 1999).

b.3) Solvant porogène

La nature du solvant de polymérisation est un paramètre clé dans la sélectivité du MIP car il conditionne la nature et la force des interactions entre la molécule empreinte et le(s) monomère(s). Il est également capable de stabiliser le complexe monomère fonctionnel/

Chapitre 1 : Etude bibliographique

molécule cible formé pendant toute la période de la synthèse (Selligren, 1999). En outre, la quantité et la qualité d'un solvant porogène peuvent influencer la qualité et la structure du MIP en termes de morphologie, gonflement, taille des pores (Esfandyari-Manesh *et al.*, 2011).

Le choix du solvant nécessite les contraintes suivantes :

- Les réactifs doivent être solubles dans le solvant.
- Le solvant doit être capable de produire des pores relativement larges pour permettre l'entrée et la sortie de la molécule cible au sein du polymère (Pichon & Chapuis-Hugon, 2008).

Le solvant doit permettre une meilleure interaction entre les molécules à imprimer et les monomères fonctionnels (Chapuis *et al.*, 2005 ; Pichon & Haupt, 2006).

b.4) Agent réticulant

L'agent réticulant joue un rôle très important dans la construction des sites de reconnaissance et dans la morphologie de la matrice du polymère.

Les fonctions majeures de l'agent réticulant au sein du polymère sont :

- Contrôle de la morphologie de la matrice de polymère,
- Stabilisation de la liaison imprimée,
- Stabilisation mécanique de la matrice du polymère (Cormack & Elorza, 2004).
- Préservation de la structure des sites de reconnaissance du MIP.
- Facilité d'accès de la molécule cible au sein de la cavité (Selligren, 1999).

Les caractéristiques chimiques de l'agent réticulant influencent les propriétés physiques des polymères comme :

- La surface, le volume et la taille des pores.
- La taille des particules.
- Le gonflement et la résistance du polymère (Mane *et al.*, 2015).

Les agents réticulants utilisés sont présentés la figure 1.11.

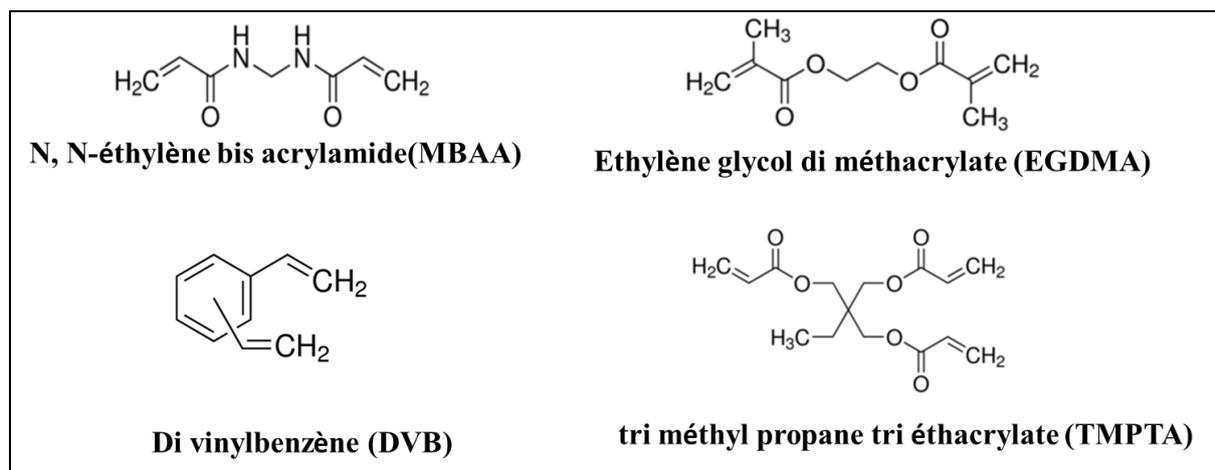


Figure 1.11. Structure des principaux agents de réticulation.

Ainsi, l'efficacité des MIPs dépend de la nature et de la quantité du réticulant utilisé. Wulff a observé que l'EGDMA conduit à un MIP de meilleure sélectivité envers la molécule cible (α -D-mannopyranoside) que le DVB. En effet, l'EGDMA présente moins d'interactions hydrophobes non spécifiques que le DVB. Il a également été observé que l'EGDMA montre une moins grande rigidité que le DVB permettant d'obtenir une matrice plus flexible qui facilite l'élimination et l'accès de la molécule cible aux cavités du MIPs (Wulff *et al.*, 1987).

En revanche, Yilmaz (1999) a montré que le polymère contenant le DVB conduisait à une meilleure interaction spécifique de la ^3H -théophylline que le polymère synthétisé à partir de l'EGDMA. Ce phénomène a été attribué au fait que le DVB qui est moins polaire que l'EGDMA permet ainsi de réduire les interactions non spécifiques entre la molécule cible et l'agent réticulant et favoriser les interactions spécifiques entre la molécule cible et le monomère fonctionnel (Yilmaz *et al.*, 1999).

Plusieurs études ont comparé l'efficacité des sites de reconnaissance en utilisant l'EGDMA ou le TRIM comme agents réticulants. Il a été observé que les MIPs synthétisés avec le TRIM étaient plus efficaces que ceux synthétisés avec l'EGDMA. Il a également été constaté que la taille et le volume des pores des MIPs synthétisés avec le TRIM étaient plus grands que ceux des MIPs synthétisés avec l'EGDMA (Xie *et al.*, 2002 ; Rajkumar *et al.*, 2007 ; Cederfur *et al.*, 2003 ; Kempe, 1996).

Yilmaz et son groupe ont montré que la proportion d'agent réticulant par rapport au monomère fonctionnel joue également un rôle important dans l'efficacité des MIPs. Plus la

proportion d'agent réticulant est grande et plus la différence entre les MIPs et les NIPs est importante (Yilmaz *et al.*, 1999).

En général, la quantité d'agent réticulant utilisée pour la synthèse des MIPs est supérieure à 80% (Cormack & Elorza, 2004 ; Yan & Ho Row, 2006).

b.5) Initiateur de polymérisation

Il est possible d'utiliser des agents chimiques aux propriétés différentes pour initier la polymérisation radicalaire. Ils sont présentés à la figure (1.12).

En général, la quantité d'initiateur utilisée est faible en comparaison de celle du monomère, soit 1% ou 2% en masse (Piletska *et al.*, 2005a ; Lanza *et al.*, 2001) ou 1% en mol (Claude, 2007). L'initiateur le plus utilisé est de la famille des azo-amorceurs car ces derniers sont capables d'amorcer un grand nombre de monomères, et cela par voie thermique ou photochimique (Selligren, 1999).

L'étape d'initiation sera effectuée généralement de façon thermique, photochimique (U.V.) ou électrique (Bakas *et al.*, 2013b ; Bastide *et al.*, 2005 ; Özcan *et al.*, 2008).

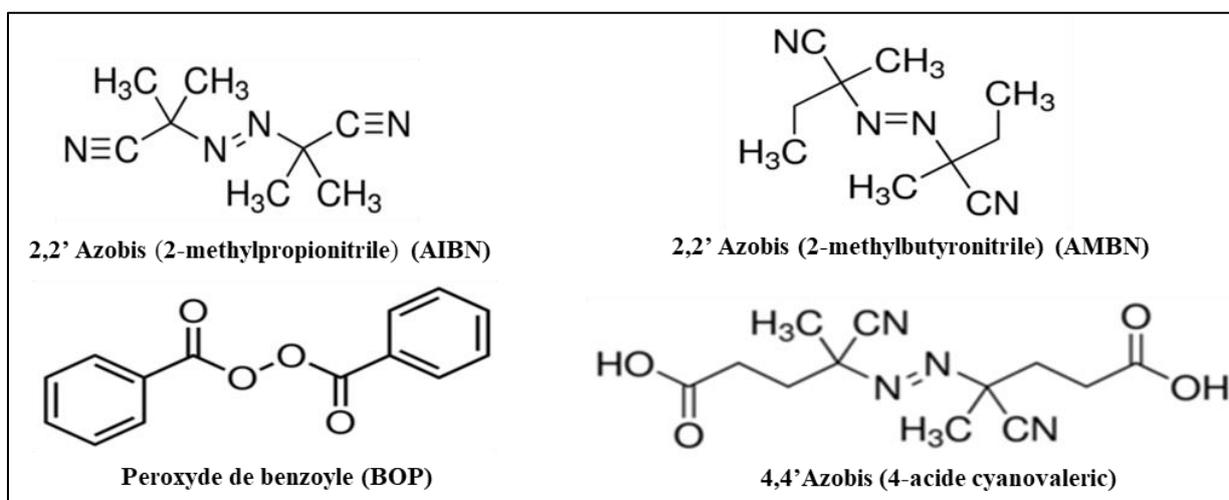


Figure 1.12. Structure chimique des amorceurs de polymérisation.

Ces azo-amorceurs présentent un inconvénient car ils forment avec l'oxygène des radicaux stables qui inhibent la polymérisation. Pour augmenter le pourcentage de propagation de la polymérisation, il faut éliminer l'oxygène du milieu réactionnel en utilisant un bain à ultrasons ou en faisant barboter un gaz inerte dans le milieu (diazote ou argon) (Yan & Ho Row, 2006 ; Tehfe *et al.*, 2013).

b.6) Influence de la température

Les étapes les plus importantes pour optimiser la qualité des MIPs sont la stabilité du complexe de pré-polymérisation (monomère fonctionnel-molécule cible) et la formation d'un réseau poreux homogène, tant par la taille et le volume des pores que par la distribution des sites d'adsorption spécifiques. Plusieurs études expliquent que la température peut avoir un effet direct sur les propriétés de reconnaissance des MIPs (Lu *et al.*, 2004 ; Bitar *et al.*, 2015b ; Yilmaz & Basan, 2015). Ces publications ont comparé l'efficacité des MIPs qui sont synthétisés à différentes températures : le résultat des observations a révélé que la réaction de polymérisation était complète à haute température mais que le complexe de pré-polymérisation (monomère fonctionnel-molécule cible) était beaucoup plus stable à basse température. Il est donc nécessaire d'opter pour une température adaptée et spécifique à chaque complexe monomère fonctionnel-molécule cible.

c) Différents formats de polymérisation des MIPs

Le choix du type de polymérisation est primordial lors de la synthèse des MIPs car il conditionne les propriétés de reconnaissance mais surtout les caractéristiques physiques du polymère.

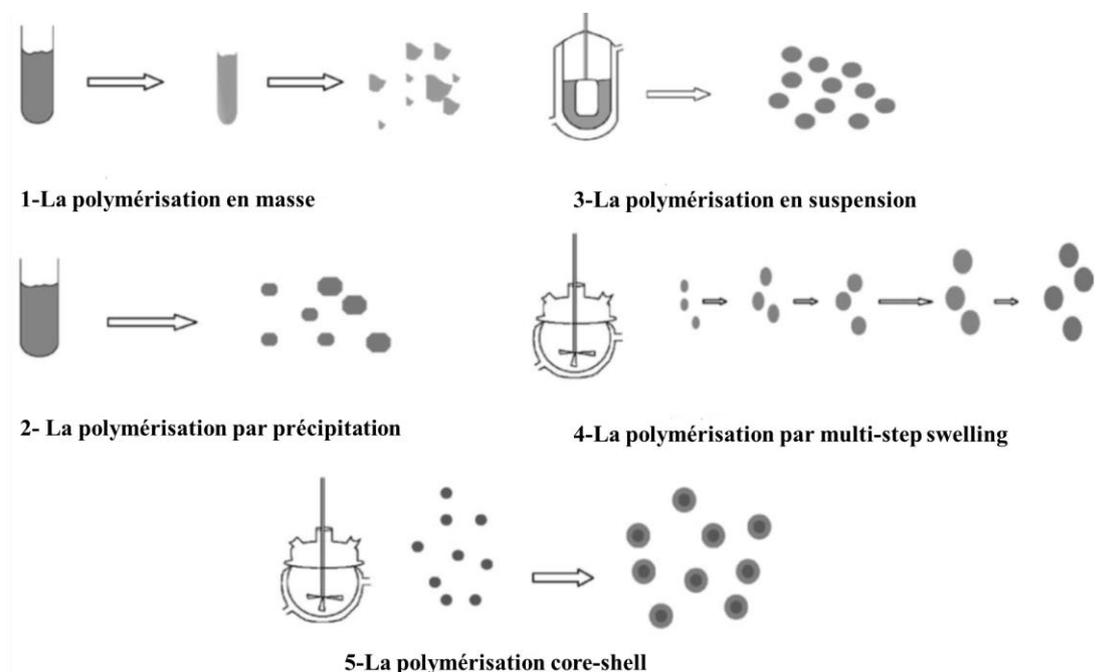


Figure 1.13. Schéma des différentes techniques de polymérisation (adapté de Pérez-Moral & Mayes, 2004).

Généralement, la polymérisation radicalaire est le mécanisme préférentiellement choisi. On peut différencier deux types principaux de polymérisation selon la forme de la taille de particules obtenues : les particules de forme irrégulière et les particules de forme homogène. La figure 1.13 présente de façon schématique la forme et la taille des particules obtenues en utilisant différentes techniques de polymérisation des MIPs.

c.1) Particules de forme irrégulière, cas de la polymérisation en masse

Grâce à sa simplicité et à son coût de production réduit, la polymérisation en masse est la méthode la plus utilisée pour obtenir des particules irrégulières issues de la fragmentation d'un polymère monolithique.

Les étapes de polymérisation sont les suivantes et sont présentées dans la figure 1.14 :

- Diluer tous les réactifs de polymérisation avec un petit volume de solvant porogène dans un tube en verre.
- Apporter l'énergie par voie thermique (bain-marie) ou par voie photochimique (lampe UV) pendant un temps fixé (en général 24h).
- Obtenir un monolithe dur (nécessité de briser le tube, de broyer le monolithe et de le tamiser à une taille spécifique).

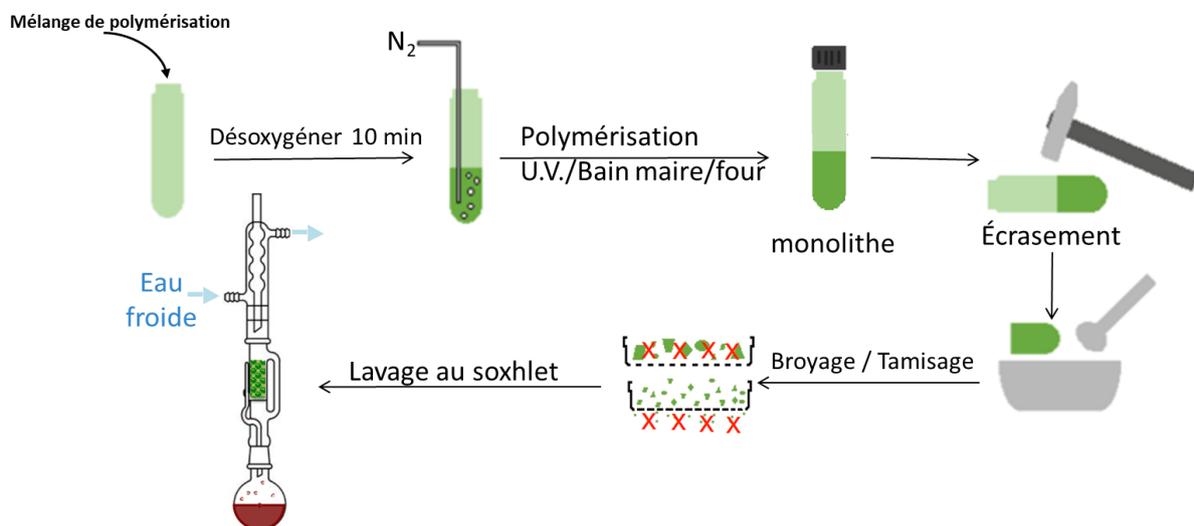


Figure 1.14. Différentes étapes de la polymérisation en masse.

Avantages

- ✓ Rapidité et simplicité en préparation.
- ✓ Aucune exigence pour une instrumentation sophistiquée ou coûteuse pour produire des MIPs.

Inconvénient

- Etapes de broyage et de tamisage chronophages.
- Particules irrégulières en forme et en taille.
- Sites à faible affinité car les sites de reconnaissance perdent leurs propriétés pendant les étapes de broyage et de tamisage.
- Nécessité d'une grande quantité de molécules empreintes (Chen *et al.*, 2016).

Afin de surmonter les inconvénients de la polymérisation en masse, des techniques de polymérisation plus sophistiquées et complexes ont été proposées pour obtenir des MIPs avec des tailles de particules homogènes, plus sélectifs au niveau de la reconnaissance moléculaire.

c.2) MIPs constitués de billes de taille homogène

Les particules de MIPs homogènes peuvent être préparées selon une variété de procédés de polymérisation attrayants, tels que la polymérisation par précipitation, la polymérisation en suspension, la polymérisation par multi-step-swelling et la polymérisation « core-shell ».

➤ **Polymérisation par précipitation**

La polymérisation par précipitation (PP) est la technique la plus utilisée pour l'obtention de particules sphériques de taille appropriée pour l'application MISPE, en une seule étape de préparation (Beltran *et al.*, 2010). Elle est semblable à la polymérisation en masse mais fait intervenir un volume de solvant porogène de 2 à 10 fois plus important.

La polymérisation par précipitation est un procédé de polymérisation hétérogène sans agent tensioactif qui commence initialement sous la forme d'une solution homogène d'agent de réticulation et de monomère (typiquement <5% poids / volume) dans un mélange de solvant porogène (étape A, figure 1.15).

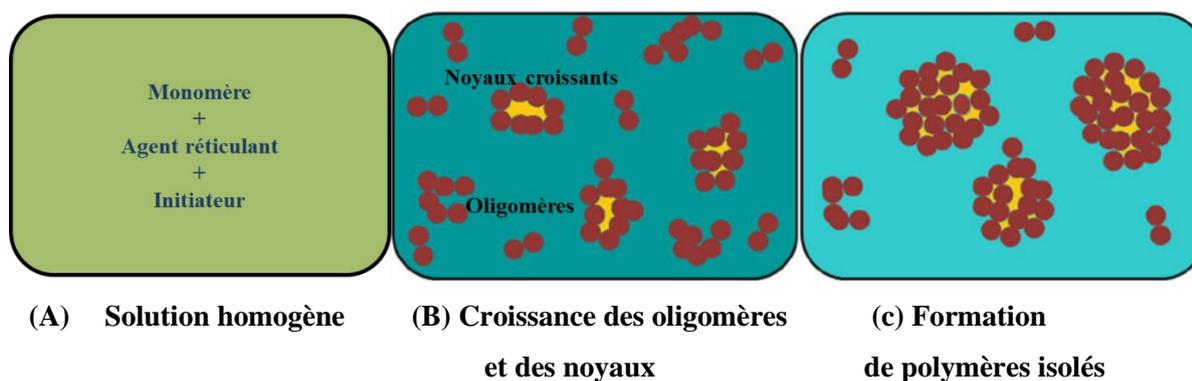


Figure 1.15. Description schématique des étapes de polymérisation par précipitation pour la formation des particules de MIP poreux.

(A) Initialement, le monomère, l'agent réticulant et l'initiateur sont dissous dans le mélange de solvant porogène et non porogène, ce qui entraîne la formation d'un système homogène. (B) La croissance des oligomères et des noyaux s'effectue par polymérisation radicalaire. (C) Les « noyaux » formés grossissent par ajout de nouvelles molécules de monomères et d'oligomères du milieu entraînant la formation de polymères séparés (le solvant porogène est représenté par une couleur jaune et le solvant non porogène par une couleur bleu) (Pardeshi & Singh, 2016).

Au début de la polymérisation, des oligomères et des noyaux de polymères commencent à se former ; les oligomères sont encore solubles dans le milieu réactionnel alors que les noyaux précipitent, ce qui rend le mélange hétérogène (étape B sur la figure 1.15).

En poursuivant la polymérisation, les noyaux ne s'agglomèrent pas entre eux mais continuent de croître par addition de nouveaux monomères et oligomères. Le rôle du solvant porogène est de maintenir les particules séparées et de contribuer à la formation des pores dans les particules de polymères (étape C sur la figure 1.15).

En résumé, le polymère croît et conduit à la formation, dans des conditions appropriées, de billes de l'ordre du micro ou sub-micromètre. A travers cette méthode, des particules sphériques peuvent être obtenues en routine avec un bon rendement (Pardeshi & Singh, 2016).

Il faut contrôler les paramètres de polymérisation (température, volume de solvant porogène, vitesse d'agitation...) afin d'obtenir un MIP sélectif de la molécule cible (Chen *et al.*, 2011).

Avantages

- ✓ Unique étape préparatoire, haute qualité, uniforme.
- ✓ Particules sphériques.
- ✓ Méthode largement utilisée pour préparer des MIPs pour applications chromatographiques.

Inconvénient

- Nécessité d'une grande quantité de molécule empreinte pour la synthèse.
- Facteur de dilution élevé (Chen *et al.*, 2016).

➤ **Polymérisation en suspension**

Elle consiste en l'étape suivante : créer, sous forte agitation des gouttelettes contenant les monomères fonctionnels, la molécule empreinte, le solvant porogène organique et l'initiateur dans une phase dite « dispersante ». L'autre phase de dispersion consiste en la stabilisation de chaque gouttelette par l'adjonction de surfactants dans l'eau et sous forte agitation. Chaque gouttelette est un microréacteur produisant la polymérisation (Mayes & Mosbach, 1996).

Avantages

- ✓ Obtention de billes de taille homogène et sphériques à la fin de la polymérisation.
- ✓ Procédé simple avec une étape de polymérisation.

Inconvénient

- Grande taille de particules.
- Mauvaise reconnaissance de la molécule empreinte (Chen *et al.*, 2016).
- Cette méthode reste peu employée parce que le choix de solvants et de surfactants est complexe. De surcroît, elle est uniquement utilisée avec des molécules empreintes solubles dans des solvants porogènes organiques (Mayes & Mosbach, 1996).

➤ **Polymérisation par multi-step swelling**

Cette méthode a été développée pour améliorer l'uniformité de la taille des particules des MIPs, augmenter le rendement de synthèse par rapport à la polymérisation en suspension pourtant déjà très élevé et accroître la sélectivité des MIPs (Sambe *et al.*, 2006).

L'idée de cette méthode est d'obtenir des cavités localisées à la surface des particules sphériques inertes, ces billes formant un support pour le MIP. Le principe de cette méthode consiste en plusieurs étapes (Beltran *et al.*, 2010) présentée dans la figure (1.16).

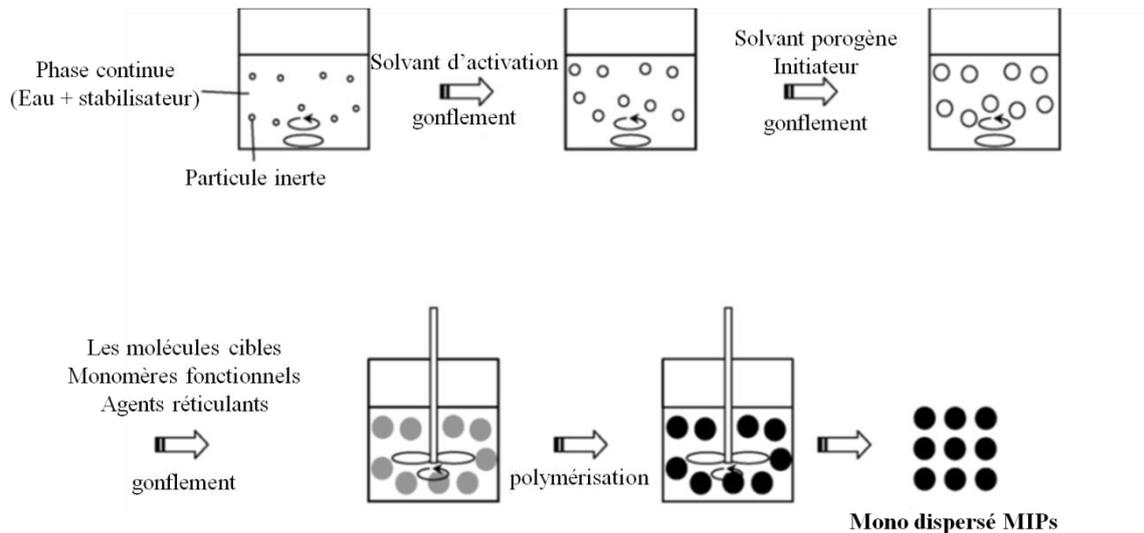


Figure 1.16. Méthode de préparation de MIPs monodispersés par gonflement et polymérisation en plusieurs étapes (Haginaka, 2008).

Les étapes de polymérisations sont les suivantes :

- Disperser des billes dans de l'eau (billes de polystyrène par exemple) et dans un solvant d'activation pour gonfler et activer la surface des billes en agitant jusqu'à absorption complète du solvant à température ambiante.
- Ajouter un initiateur et le solvant porogène.
- Disperser les particules des polystyrènes avec le monomère fonctionnel et l'agent réticulant sous faible agitation (généralement pendant 2h).
- Ajouter les molécules cibles.
- Polymériser ce mélange par voie thermique ou par voie U.V. (Yoshizako *et al.*, 1998) (Fu *et al.*, 2003).

Avantages

- ✓ Particules sphériques régulières.
- ✓ MIP utilisable comme phase stationnaire dans des colonnes HPLC ou GC (Mayes & Mosbach, 1996).

Inconvénients

- Méthode chronophage, processus laborieux (Chen *et al.*, 2016).
- Nécessité d'utiliser une phase aqueuse (Mayes & Mosbach, 1996).

Au regard de la difficulté de réalisation des réactions de synthèse polymérique par le biais de cette méthode, l'utilisation d'émulsions aqueuses est nécessaire (Pérez-Moral & Mayes, 2004).

➤ **Polymérisation core-shell (ou polymérisation noyau enveloppe)**

Cette technique de polymérisation ressemble à la polymérisation par multi-step swelling, et se déroule en plusieurs étapes :

- Toutes les étapes de polymérisation sont identiques à celle de la polymérisation par multi-step swelling (polymérisation à partir de billes de polystyrène). Cependant, il est nécessaire d'ajouter dès le début un surfactant polymérisable pour contrôler l'hydrophobie de la surface des particules et la position de la molécule empreinte à la surface des billes.
- Les chaînes de surfactants enrobent les particules de polymères créant alors une structure de type « coreshell ».

La présence de chaînes de surfactants à la surface du polymère permet de rendre les billes plus hydrophiles et ainsi plus compatibles avec des solvants de recapture polaires.

Les particules de MIPs obtenues ont un diamètre inférieur à celui des particules obtenues par multi-step swelling (Yan & Ho Row, 2006).

Donc les avantages et inconvénients de cette méthode restent les mêmes que ceux de la polymérisation par multi-step swelling.

1.2. Insecticides organophosphorés utilisés en oléiculture

Dans cette partie, après avoir présenté les insecticides organophosphorés (OPs) et leur mode d'action, nous passerons en revue les méthodes d'extraction de ces composés dans l'huile d'olive et les méthodes d'analyse.

1.2.1. Insecticides organophosphorés (OPs)

Depuis toujours, l'Homme a utilisé des substances minérales (cuivre, arséniate de plomb...) ou végétales pour combattre les organismes vivants indésirables dans l'agriculture. Les chimistes ont ensuite synthétisé des substances organiques pouvant jouer ce rôle et dénommées « pesticides ». L'agence Américaine de Protection de l'Environnement (EPA) classe les pesticides en six groupes et en fonction de leur action sur les différents types de parasites :

- a. Insecticides : les composés chlorés, les organophosphorés, les insecticides carbamates, les pyréthrénoïdes, les produits botaniques et biologiques.
- b. Herbicides : phenoxy, triazines, amides, les herbicides carbamates, dinitro-anilines dérivés d'urée, sulfonylurées, uraciles.
- c. Fongicides, bactéricides et traitement de graines : inorganique, dithiocarbamates, benzimidazoles, triazoles, diazoles, diazines, morpholines.
- d. Huiles minérales.
- e. Régulateurs de croissance de plantes.
- f. Rodenticides : anticoagulants (*Recognition and Management of Pesticide Poisonings: Sixth Edition: 2013*).

Bien qu'un grand nombre d'organophosphorés aient été synthétisés vers 1800, leur synthèse pour une utilisation comme insecticide date seulement de la fin des années 1930 et du début des années 40. Cette période correspond à la découverte par Gerhard Schrader de la structure chimique générale des organophosphorés anticholinestérasiques et de la synthèse du premier OP commercialisé comme insecticide. Le pesticide le plus utilisé dans le monde, le parathion, est commercialisé depuis 1944 (Costa, 2006). Depuis lors, les insecticides organophosphorés sont synthétisés et vendus dans le commerce comme insecticides non

Chapitre 1 : Etude bibliographique

spécifiques pouvant agir sur une large gamme d'insectes dans l'agriculture (Colovic *et al.*, 2013).

Les insecticides organophosphorés, esters de l'acide phosphorique, ont la structure chimique générale suivante (figure 1.17) :

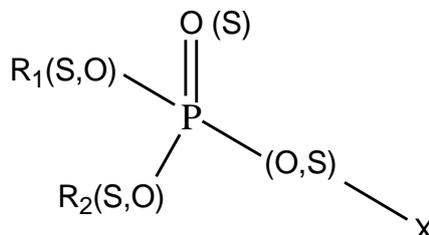


Figure 1.17. Structure générale d'un organophosphoré.

X : groupe partant quand l'organophosphoré OPs est lié à l'acétylcholinestérase (AChE). Ce groupe, très sensible à l'hydrolyse, est échangeable avec des réactifs nucléophiles.

R₁, R₂ : groupe alcoxy (R-O-) ou R-S- qui ont une stabilité accrue vis-à-vis de l'hydrolyse.

La figure 1.18 présente l'hydrolyse d'un organophosphoré.

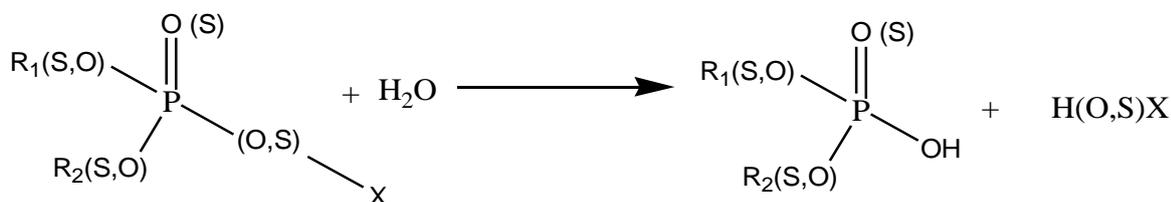


Figure 1.18. Réaction d'hydrolyse des organophosphorés.

La plupart des insecticides organophosphorés sont commercialisés sous forme organothiophosphate et deviennent plus toxiques par oxydation (métabolisation) du groupement P=S en P=O (Costa, 2006).

Le phosmet a été déclaré pour la première fois aux États-Unis en 1966 comme insecticide à large spectre pour le contrôle d'une grande variété d'insectes, y compris la mouche de l'olive... Au delà du traitement pour les cultures, ce composé est utilisable pour les traitements antiparasitaires, contre les puces, les poux..., sur les animaux domestiques et d'élevage. Le nom chimique du phosmet est O,O-diméthyl-S-phthalimidométhyl phosphorodithioate (IUPAC), sa structure chimique est présentée dans la figure 1.19.

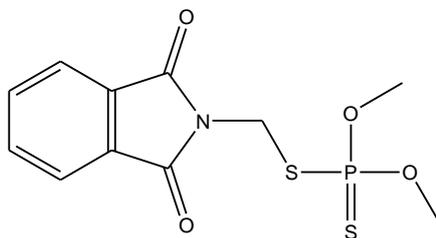


Figure 1.19. Structure chimique du phosmet.

Au niveau des caractéristiques physico-chimiques : sa masse molaire est de $317,32 \text{ g.mol}^{-1}$, son point de fusion de $66-69 \text{ }^\circ\text{C}$. Il est légèrement soluble dans l'eau (20 mg.L^{-1} à $20-25 \text{ }^\circ\text{C}$), plus soluble dans l'éthanol et le kérosène ($<1,0 \text{ g} / 100 \text{ mL}$) et facilement soluble dans l'acétone, le chloroforme et le xylène ($> 100 \text{ g} / 100 \text{ mL}$). Son coefficient de partage octanol/eau vaut 2,95 et se rapproche donc de celui d'une molécule apolaire ou à faible polarité. De façon générale, si la constante de partage octanol/eau est comprise entre 1 et 3, la molécule est modérément polaire, et apolaire si la constante de partage est supérieure à 3 (Chapuis *et al.*, 2005) .

1.2.2. Mode d'action des OPs (neurotoxiques → inhibition AChE)

La toxicité des organophosphorés provient de l'inhibition irréversible de l'acétylcholinestérase par blocage du site actif sous une forme phosphorylée. Cela conduit à accumuler l'acétylcholine au niveau de la synapse, tout en maintenant l'activation des récepteurs muscariniques et nicotiniques, entraînant la mort des êtres vivants de tout genre (Lukaszewicz-Hussain, 2010). La vitesse d'accumulation de l'acétylcholine au niveau de la synapse est dépendante de la dose d'insecticides organophosphorés qui entre dans l'organisme. La toxicité des organophosphorés se manifeste sur l'organisme par une crise cholinergique avec des sécrétions glandulaires excessives, une faiblesse générale puis une fasciculation du muscle (Lukaszewicz-Hussain, 2010)

Pour bien comprendre le mode d'action du composé organophosphoré sur l'organisme, nous allons expliquer tout d'abord le rôle de l'acétylcholinestérase au niveau du système nerveux périphérique et centrale.

a) Role de l'AChE

L'acétylcholinestérase (AChE) est une enzyme responsable de l'hydrolyse très rapide de l'acétylcholine (ACh) en choline et en acide acétique dans la fente synaptique (figure 1.20).

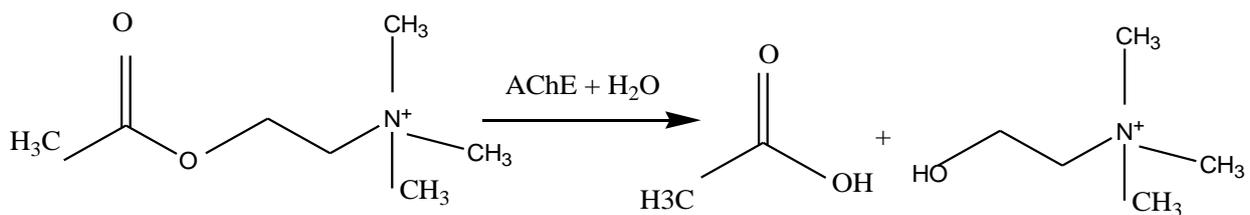


Figure 1.20. Schéma d'hydrolyse de l'acétylcholine.

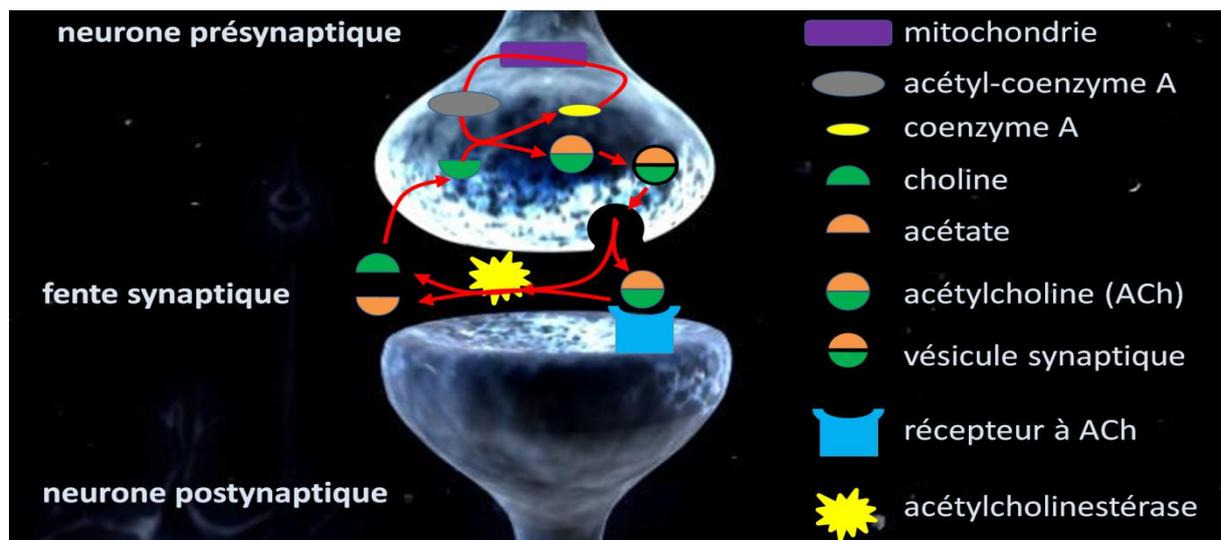


Figure 1.21. Schéma d'une synapse cholinergique.

L'acétylcholine (ACh) est produite dans le neurone présynaptique et est ensuite libérée par exocytose dans la fente synaptique où elle diffuse. Elle peut alors se lier aux récepteurs muscariniques et nicotiniques situés sur la membrane postsynaptique. L'acétylcholinestérase est responsable de la dégradation de l'ACh en acétate et choline (adapté de Sanson, 2009).

Cependant, l'acétylcholine est produite dans le neurone présynaptique et est ensuite libérée par exocytose dans la fente synaptique où elle diffuse et se lie réversiblement au récepteur nicotinique ou muscarinique pour transmettre l'influx nerveux au sein des jonctions neuromusculaires et synapses cholinergiques (figure 1.21) (Silman & Sussman, 2005).

L'acétylcholinestérase joue donc un rôle très important pour rétablir l'équilibre neuromusculaire et restaurer les conditions nécessaires à la transmission d'un nouvel influx nerveux (Quinn, 1987).

b) Structure secondaire et tridimensionnelle

L'acétylcholinestérase a une forme ellipsoïdale (dimensions 45 Å, 60 Å, 60 Å) et présente une gorge de 20 Å en forme de goulot qui mène au site actif, lui-même constitué de deux sous-sites actifs : le site anionique permet de fixer le substrat l'acétylcholine (ACh) par interaction ionique avec l'ammonium quaternaire de la choline, alors que le site estérasique à sérine est responsable de l'activité catalytique (hydrolyse). La structure secondaire de l'enzyme et le schéma du site actif sont présentés dans les figure 1.22 et 1.23 (Sussman *et al.*, 1991 ; Colovic *et al.*, 2013).

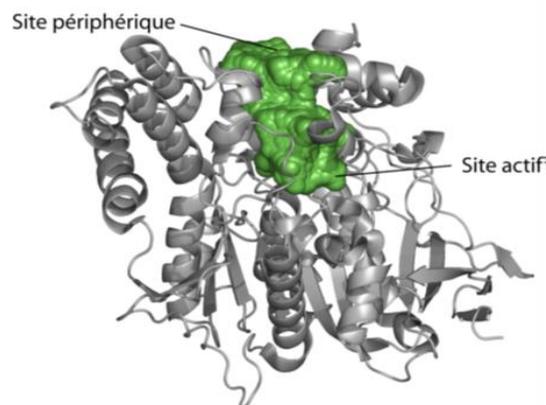


Figure 1.22. Structure tertiaire de l'acétylcholinestérase (en gris). La surface de la gorge, qui plonge pratiquement jusqu'au centre de l'enzyme, apparaît en vert (adapté de Sanson, 2009).

Le site anionique est constitué des résidus Trp84, Glu199 et Phe330 pouvant contribuer de manière électrostatique à la stabilisation de la charge positive de l'ACh (Harel *et al.*, 1993).

Le site estérasique est responsable de l'hydrolyse de l'ACh en acétate et en choline. Il constitue la triade catalytique suivante : sérine 200, histidine 440 et glutamate 327. La sérine 200 est au cœur des deux étapes essentielles de la réaction catalytique (Gibney *et al.*, 1990 ; Shafferman *et al.*, 1992).

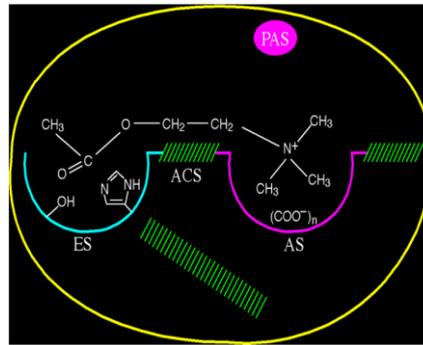


Figure 1.23. Schéma représentant la localisation des sites dans l'enzyme acétylcholinestérase. ES : site estérasique ; AS : site anionique ; les chaînes latérales d'imidazole et d'hydroxyle de l'acide aminé histidine et de la sérine sont représentés dans le site estérasique ; $(\text{COO}^-)_n$ représente les n résidus dans le site anionique (Dvir *et al.*, 2010).

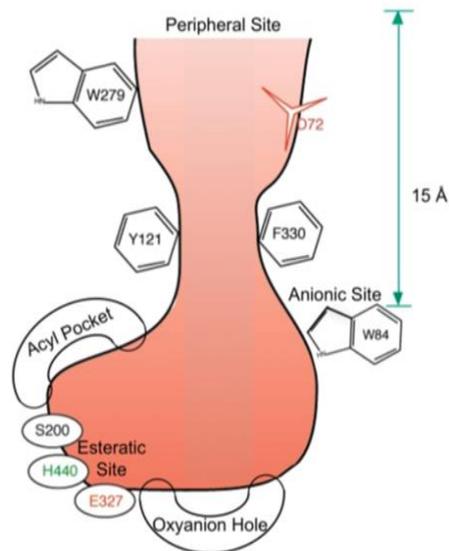


Figure 1.24. Schéma du site actif et de la gorge de l'AChE (Dvir *et al.*, 2010).

En sus des deux sous-sites actifs, l'AChE possède un ou plusieurs sites de liaison supplémentaires pour l'ACh, et pour d'autres ligands quaternaires, identifiés comme des sites périphériques anioniques (PAS) (figure 1.24).

c) Le mécanisme d'hydrolyse de l'acétylcholine par l'acétylcholinestérase :

En premier lieu, l'enzyme et le substrat forment un complexe réversible Enzyme-Substrat (ES) nommé aussi « complexe Michaëlien ». En second lieu, le groupement acétyle de la molécule d'acétylcholine se lie à la Sérine 200 pour former un complexe intermédiaire (Enzyme Acétylée). L'acétylcholine est alors clivée et la portion de choline est expulsée

(cette étape est nommée l'acétylation). En dernier lieu, l'enzyme acétylée subit une attaque nucléophile par une molécule d'eau à l'aide du groupe histidine 440 afin de libérer un acide acétique et régénérer l'enzyme libre. Cette étape est nommée dé-acétylation de l'enzyme (Marcel *et al.*, 1998 ; Andreescu, 2002).

d) Inhibiteurs de l'acétylcholinestérase

Les organophosphorés agissent comme des pseudo-substrats pour cette enzyme. Ils forment un complexe enzyme-inhibiteur (complexe de Michaëlis). La phosphorylation s'effectue sur le résidu de sérine du site actif de l'enzyme, avec un départ concomitant du groupement hydroxyle. Après la phosphorylation, l'enzyme phosphorylée est plus stable que l'enzyme acétylée. La durée de rupture de la liaison carbone-enzyme prend quelques microsecondes alors que la rupture de la liaison phosphore-enzyme prend de quelques heures à plusieurs jours. La durée de rupture de la liaison dépend de la structure chimique de l'organophosphoré (Costa, 2006).

Les organophosphorés inhibent donc l'acétylcholinestérase de façon irréversible et la stabilité de l'enzyme phosphorylée dépend des groupes R_1 et R_2 qui relient l'atome de phosphore à la structure des organophosphorés.

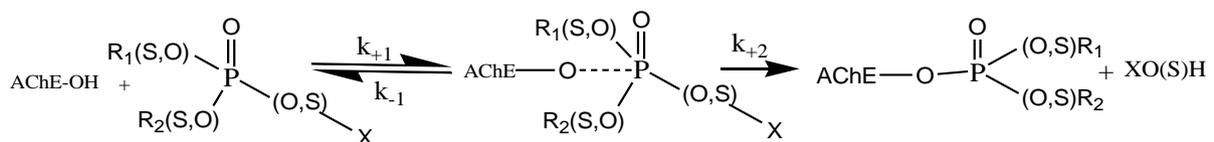


Figure 1.25. Réaction d'inhibition de l'acétylcholinestérase par les organophosphorés (Worek *et al.*, 2004).

Par conséquent, en raison de leur rôle très important dans l'inhibition irréversible de l'AChE, il est donc capital de détecter les OPs dans les matrices alimentaires.

1.2.3. Oléiculture et traitements aux OPs

La pratique de l'oléiculture et la production d'huile d'olive dans le bassin méditerranéen dateraient d'avant Jésus-Christ. De nos jours, la production d'huile d'olive est en plein essor. Cette matière grasse alimentaire, riche en vitamines D et E, en acides gras et en

Chapitre 1 : Etude bibliographique

composés phénoliques, est très prisée par les consommateurs qui pensent qu'elle joue un rôle important dans la santé humaine (Artaud, 2008 ; Cunha *et al.*, 2010 ; Gimeno *et al.*, 2002).

Avec une augmentation moyenne annuelle de la production (47,5 milliers de tonnes/an) et de la consommation (43,6 milliers de tonnes/an) mondiales d'huile d'olive entre 1990 et 2016, la nécessité d'une détection efficace et d'une quantification précise des teneurs d'OPs contaminant la matière grasse végétale ne fait aucun doute. Le tableau 1.3 permet de mieux appréhender les volumes conséquents de production et de consommation d'huile d'olive en Europe, dans certains pays et au niveau international.

Tableau 1.3. Production et consommation moyennes d'huile d'olive en Europe et dans certains pays du monde entre 2010 et 2016 (IOOC 2016).

Pays	Production		Pays	Consommation	
	Milliers de tonnes d'huile d'olive	Pourcentage %		Milliers de tonnes d'huile d'olive	Pourcentage %
Europe	2.050,8	69,6	Europe	1.705,3	56,6
Tunisie	178,7	6,1	Etats-Unis	294,8	9,8
Turquie	164	5,6	Syrie	138	4,6
Syrie	158	5,4	Turquie	130,8	4,3
Maroc	121,7	4,1	Maroc	118,5	3,9
Etats-Unis	5,7	0,2	Tunisie	34,5	1,1
Total mondial	2.944,5	100	Total mondial	3.012,1	100

Le tableau 1.3 montre que l'Europe est le plus gros producteur/consommateur d'huile d'olive de la Planète (69,6% de la production mondiale et 56,6% de la consommation mondiale). Par ailleurs, l'exemple d'un pays comme les Etats-Unis qui se positionne comme le deuxième plus gros consommateur au monde après la communauté européenne et un des plus faibles producteurs montre l'importance de la demande en huile d'olive et surtout la nécessité pour les plus gros exportateurs comme l'Europe d'offrir une matière

grasse végétale expurgée de tout OPs et donc sans risque pour la santé humaine. En outre, l'augmentation croissante de la consommation mondiale pousse les producteurs d'huile d'olive à rechercher le meilleur rendement de production en faisant appel à des insecticides toujours plus efficaces.

Pour obtenir un rendement de production qualitatif et quantitatif satisfaisant, il est nécessaire d'éliminer certaines imperfections à la surface de l'olive comme les cicatrices et les crevasses causées par les insectes. La mouche de l'olive *Bactrocera oleae* est responsable d'une perte annuelle de 30% de la production d'huile d'olive. Depuis les années 40, des traitements insecticides à base d'organophosphorés sont appliqués sur les oliviers afin de les débarrasser notamment de la larve de cette mouche (Cunha *et al.*, 2010). Les traitements insecticides les plus largement utilisés dans les plantations d'oliviers pour éradiquer cet insecte sont le fenthion, le diméthoate, le diazinon, le méthyl-parathion, le méthidathion, l'éthyl-azinphos et le phosmet... Dans le cas du phosmet, les bonnes pratiques agricoles recommandent en France 2 applications annuelles à la dose de 750 g de phosmet /ha traité, le délai d'application avant récolte est de 28 jours.

Les résidus de ces traitements insecticides peuvent pénétrer le fruit et persister jusqu'à la phase de récolte contaminant ainsi les olives destinées à la production d'huile. Dans ce cas, des traces d'organophosphorés pourront être détectées dans des échantillons d'huile d'olive au moyen des techniques de reconnaissance actuelles.

1.2.4. Présence des OPs dans l'huile d'olive

En Europe, la présence d'organophosphorés dans l'huile d'olive s'est imposée comme un enjeu de santé publique pour lequel l'Union Européenne et l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (FAO ou ONUAA) se sont inquiétées. Pour déterminer la Limite Maximale de Résidus d'organophosphorés (LMR) dans les olives et l'huile d'olive, ces deux institutions ont établi des réglementations fixant des limites précises (Food & Authority, 2012). Ces valeurs sont fixées à hauteur de 0,05 à 5 mg.kg⁻¹ pour 94 résidus de pesticides dans l'olive et l'olive pour la production l'huile d'olive. Dans le cas du phosmet, la LMR en vigueur est de 3 mg/kg d'olives ou d'huile d'olives (*EU Pesticides database - European Commission*) (*Global MRL Database - Home*).

La surveillance des résidus de pesticides dans l'huile d'olive s'avère donc primordiale afin d'assurer la «sécurité alimentaire» des consommateurs. Pour atteindre cet objectif, le développement de méthodes de détection performantes, permettant de déterminer de faibles concentrations de résidus est nécessaire. Ces méthodes conventionnelles ou alternatives de détection des organophosphorés nécessitent parfois un traitement préalable de l'échantillon avant d'entamer l'étape de détection à proprement parler.

1.2.5. Méthodes d'extraction des organophosphorés

L'extraction des résidus de pesticides dans l'huile d'olive est très difficile, en raison de la complexité inhérente de la matrice, principalement constituée de triglycérides (98-99%). Cela entraîne la nécessité de différentes stratégies pour isoler ou extraire la fraction de pesticides de toute la matrice grasse. En fait, il est très difficile d'éviter la co-extraction de matières grasses car les résidus de pesticides ont tendance à se concentrer et à rester dans la graisse. Idéalement, l'extrait ne doit pas contenir de graisse, pour éviter d'endommager les outils analytiques utilisés et les interférences potentielles dans l'analyse chromatographique. La plupart des OPs sont lipophiles et non polaires et tendent à se concentrer et à rester dans la matière grasse d'huile d'olive. Le rendement d'extraction est généralement bien inférieur à 100% (Gilbert-lópez *et al.*, 2009 ; Walters, 1990 ; Garcia-Reyes *et al.*, 2007).

De nombreuses études ont été réalisées pour mettre au point des procédures d'extraction, de purification et de pré-concentration des OPs dans divers échantillons huileux au moyen des méthodes suivantes :

a) Extraction liquide-liquide (ELL)

Elle est basée sur la distribution d'un analyte entre deux phases liquides en fonction de sa solubilité dans chacune d'elles (Psillakis & Kalogerakis, 2003).

A titre d'exemple, une extraction à l'acétonitrile a été réalisée pour extraire les cinq pesticides suivants d'une huile d'olive : le diméthoate, le méthyle de parathion, l'éthyle de parathion, le méthidathion et le fenthion. Le rendement de cette méthode de l'extraction, évalué suite à une chromatographie en phase gazeuse couplée à un photomètre de flamme, est compris entre 78 et 97% (Dugo *et al.*, 2005). Dans cette étude, on considère que la procédure d'ELL est convenable pour l'extraction des OP étudiés alors qu'elle peut parfois

s'avérer insuffisante lorsque la présence de résidus d'huile dans les extraits finaux interfère au niveau de la détection. Dans ce dernier cas, il est alors nécessaire d'utiliser d'autres méthodes d'extractions comme l'extraction sur phase solide « Solid Phase Extraction » (SPE).

b) Extraction sur phase solide (SPE)

b.1) Principe

L'extraction solide-liquide est fondée sur la distribution des composés entre la phase liquide (échantillon) et la phase solide (adsorbant choisi). Le soluté présente une forte affinité avec l'adsorbant, il y reste totalement fixé au cours de la percolation de l'échantillon liquide. L'emploi d'un petit volume de solvant éluant désorbe ensuite le soluté (Pichon, 2006).

b.2) Diversité des techniques d'extraction sur phase solide

Il existe plusieurs mécanismes pour extraire les pesticides des échantillons sur phase solide.

b.2.1) Extraction sur phase solide (SPE)

Elle est basée sur le remplissage de la phase solide dans une cartouche, plaque 96-puits, un disque, pipette tips SPE... Le choix de la phase solide dépend du volume de l'échantillon percolé et du type des échantillons. La figure 1.26 présente les différents dispositifs disponibles à l'extraction solide-liquide (Lordel, 2011).

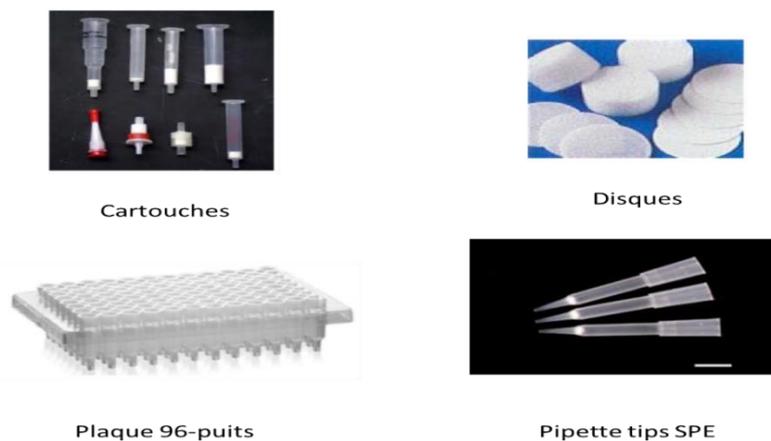


Figure 1.26. Différents dispositifs pour l'extraction sur phase solide.

Chapitre 1 : Etude bibliographique

Le principe de l'extraction solide-liquide consiste en quatre étapes présentées en figure 1.27.

- La première étape, nommée conditionnement de l'adsorbant, consiste à percoler un ou plusieurs solvants successivement ayant de polarité similaire à celle du solvant constituant l'échantillon, le but de cette étape est de mouiller le support (les groupements fonctionnels présentés à la surface de l'adsorbant) en solvant.
- La deuxième étape est la percolation de l'échantillon liquide sur l'adsorbant. Durant cette étape, les composés ciblés restent retenus sur le support. Le volume d'échantillon percolé dépend des échantillons à analyser, ainsi que du facteur d'enrichissement recherché.
- La troisième étape est l'étape de lavage, au cours de laquelle, les composés interférents sont éliminés et les composés cibles restent fixés sur le support.
- La dernière étape, appelée élution, consiste à faire percoler un solvant capable de rompre les fortes interactions entre les composés d'intérêt et l'adsorbant (Chapuis *et al.*, 2005 ; Pichon, 2006).

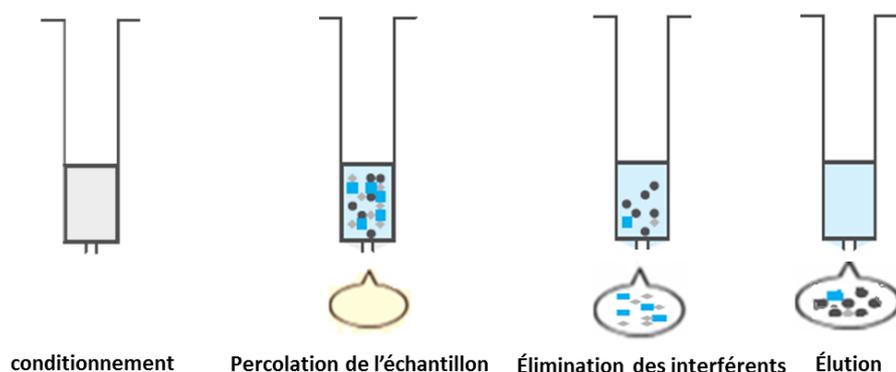


Figure 1.27. Schéma des étapes d'extraction sur phase solide (Pichon, 2006).

Amvrazi et Albanis ont développé une méthode d'extraction de 35 pesticides dans l'huile d'olive. 4 phases stationnaires (N-Alumina, Florisil, C18 et ENVI-Carb) ont été testées et la cartouche ENVI-Carb a été retenue car elle permet d'atteindre les meilleurs rendements d'extraction compris entre 70,8 et 106,0 % selon les pesticides analysés. Le groupe a également observé un effet positif de la matrice puisque les rendements d'extraction de certains pesticides organophosphorés (azinphosméthyl, phosmet, ométhoate, diméthoate, fenthion sulfoxide, méthidathion et malathion) étaient supérieurs à 110%. Il a été mentionné que cet effet de matrice pouvait être relié à la polarité des analytes et au type des éléments co-extraits dans l'échantillon. Plus la quantité d'huile utilisée pour l'extraction est grande,

plus le taux de matières grasses dans les analytes augmente conduisant ainsi à une augmentation de la réponse de détecteur. L'effet de matrice positif dépendant donc du ratio [concentration d'analytes/volume de matrice huileuse] (Amvrazi & Albanis, 2006).

b.2.2) Extraction par dispersion du support dans l'échantillon (MSPD)

Pour ce type de technique, il faut initialement mélanger l'échantillon liquide avec une phase solide, support de l'extraction, dans un rapport de masse allant de 1:1 à 1:4. Ce mélange est ensuite introduit dans une colonne ou dans une cartouche SPE avant de faire percoler un solvant qui permettra d'éliminer les composés interférents puis un solvant d'élution pour récupérer la molécule ciblée. Le principe est représenté sur la figure 1.28.

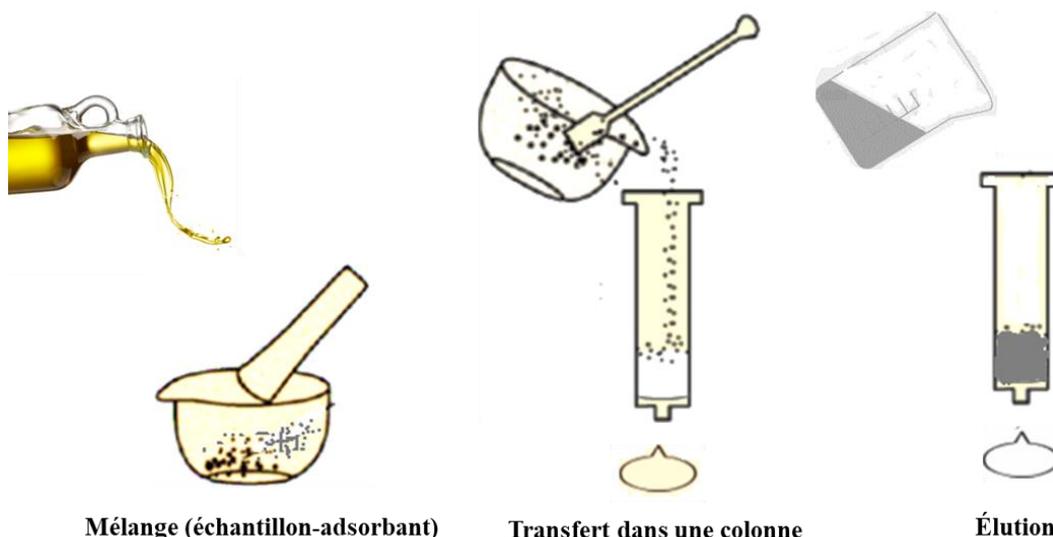


Figure 1.28. Schéma d'une extraction de type MSPD par dispersion du support dans l'échantillon.

Cette méthode MSPD a par exemple été utilisée pour extraire le phosmet et ses principaux métabolites (acide phtalique, phthalimide, N-hydroxyphthalimide, N-hydroxyméthyl phthalimide, acide phthalamique, phosmet-oxon) de l'olive en testant plusieurs phases stationnaires polaires (silice, alumine, florisil et NH_2) ou apolaire C_{18} . Les résultats montrent que seule la phase C_{18} , lorsque l'on utilise l'acétonitrile comme solvant de dispersion, permet d'extraire simultanément tous les composés recherchés. Les rendements d'extraction du phosmet et de ses métabolites par deux techniques, SPE et MSPD, utilisant la même phase solide C_{18} , ont été comparés. La technique MSPD a conduit au meilleur rendement. (Cunha *et al.*, 2007).

b.2.3) Micro extraction en phase solide sur fibre (SPME)

Cette méthode alternative permet de réaliser une extraction et une concentration des composés qui se trouvent à l'état de traces dans un liquide ou un gaz. Le support est une fibre de silice de 110 μm enrobée d'un adsorbant d'une épaisseur de 7 à 100 μm sur une longueur de 1 cm et située au bout d'une seringue (figure 1.26). Pour l'extraction des composés, la fibre est plongée dans l'échantillon à analyser soit liquide ou gaz. Les analytes recherchés vont être progressivement adsorbés par la phase stationnaire. Après un temps suffisant appelé temps d'équilibration, on atteint un état d'équilibre où les analytes sont partagés entre la phase solide constituée par la fibre et la phase gazeuse ou liquide de l'échantillon (figure 1.29). La fibre est rétractée dans le corps de l'aiguille puis sortie de l'échantillon pour être ensuite introduite dans le corps de l'insert du chromatographe en phase gazeuse. Ensuite, les analytes sont thermiquement dé-adsorbés et transportés vers la colonne par le gaz vecteur. Cette procédure est donc particulièrement adaptée à la chromatographie en phase gazeuse. Cependant, pour détecter les analytes par chromatographie en phase liquide, la fibre est introduite dans la chambre de désorption où la phase mobile va éluer les analytes de la phase stationnaire pour les transporter vers la colonne pour les analyser (Kataoka *et al.*, 2000).

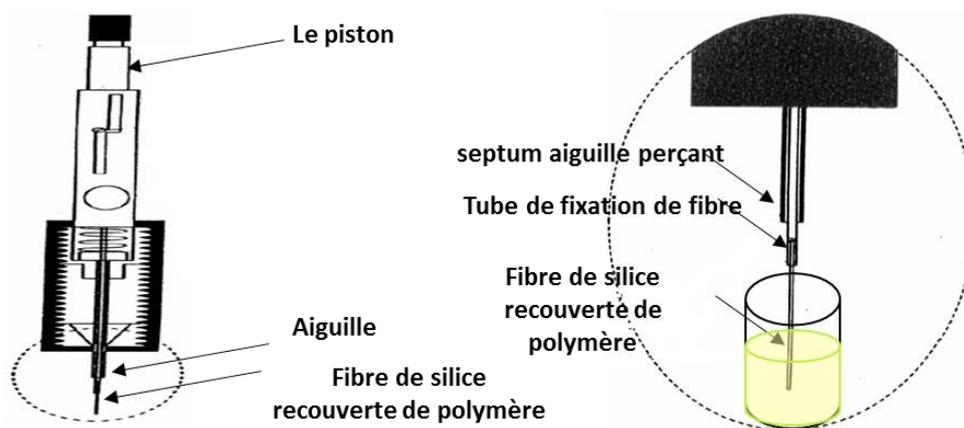


Figure 1.29. Micro-extraction en phase solide sur fibre (SPME)

(adapté de Kataoka *et al.*, 2000).

Cette méthode SPME sur fibre a été utilisée pour l'extraction des sept insecticides organophosphorés suivants : diazinon, fenitrothion, fenthion, éthyl parathion, méthyl bromophos, éthyl bromophos, éthion dans des échantillons d'huile d'olive dopés à

différentes concentrations allant de 0,025 à 0,5mg.L⁻¹. Les auteurs ont travaillé sur les conditions d'extraction (durée, température...) et sur la nature et l'épaisseur du polymère enrobant la fibre. Ils ont trouvé que le PDMS à 100 µm d'épaisseur conduisait au meilleur compromis (Tsoutsi & Albanis, 2004).

c) Diversité des supports d'extraction sur phase solide-liquide :

Il existe plusieurs phases de supports pour extraire les composés de matrices huileuses.

c.1) Supports usuels :

Les supports largement utilisés pour extraire les organophosphorés de l'huile d'olive peuvent être classés en 2 catégories principales.

Les supports dits « phase normale » sont des phases de silice, d'alumine, de Florisil (silicate de magnésium) ou des phases de silice greffée par des fonctions diols, amines ou nitriles qui sont utilisées pour l'extraction des composés généralement présents dans un milieu non polaire comme l'huile, les produits pétroliers, les cosmétiques etc.

Les supports dits « phase inverse » sont des phases de silice greffée par des groupements alkyle (C8, C18 principalement), de polystyrène-divinylbenzène (PS-DVB) et de carbone graphitique poreux (PGC), utilisées le plus souvent pour traiter des matrices aqueuses comme des échantillons d'eau, les fluides biologiques etc. Cependant, le choix de la phase d'extraction dépend aussi des caractéristiques physico-chimiques des analytes recherchés et notamment de leur polarité.

A titre d'exemple, Yagüe et ses collaborateurs ont réussi à extraire 7 organophosphorés (OP), 10 pesticides organochlorés (OC) et plus de 6 polychlorobiphényles (PCB) de l'huile d'olive vierge en utilisant des colonnes SPE en phase inverse (C18) pour les OP. Ces pesticides ont été quantifiés par chromatographie en phase gazeuse. Les résultats montrent que les rendements d'extraction pour les OP varient de 81,7% à 105,3%, pour les OC de 74,3% à 99,4%, tandis que pour les PCB de 60,1% à 119,2% (Yagüe *et al.*, 2005).

c.2) Supports à reconnaissance moléculaire

Pour la sélectivité de l'extraction, la reconnaissance moléculaire a été mise au point. Elle est généralement basée sur l'utilisation d'anticorps ou polymères spécifiques aux analytes pour les extraire directement des échantillons huileux.

c.2.1) Anticorps

La technique d'immunoabsorption utilise un support constitué d'anticorps qui possèdent une grande affinité et sélectivité avec la molécule cible (antigène) dont la reconnaissance spécifique est alors favorisée. L'interaction antigène-anticorps est très sélective. Néanmoins, cette technique demande un temps de préparation de l'anticorps important et son coût est élevé (Hage, 1998). Le principe de ce type d'extraction sélective est semblable à celui réalisé avec des MIPs, détaillé dans le paragraphe après suivant.

c.2.2) Polymères à empreinte moléculaires

C'est une technique alternative fondée sur la synthèse de polymères possédant des cavités spécifiques à une molécule cible et dénommés polymères à empreintes moléculaires « Molecularly Imprinted Polymers, MIPs ». La sélectivité des polymères à empreintes moléculaires (MIPs) est comparable à celle des immunoadsorbants. Au-delà de l'avantage lié au coût et au temps de préparation, les MIPs bénéficient d'une grande stabilité thermique et chimique. Après synthèse des MIPs selon une des voies précédemment décrites, les cartouches d'extraction sont remplies avec une masse de polymère déterminée, généralement comprise entre 50 et 200 mg. Le principe d'extraction sélective sur MIPs est détaillé dans le paragraphe ci-après.

➤ Sélectivité de MIPs pour SPE

Afin d'évaluer l'efficacité de reconnaissance des MIPs, il est indispensable de synthétiser des polymères non imprimés (synthétisés en absence de la molécule cible) et appelés NIPs. Bien que la différence entre les MIPs et les NIPs soit généralement importante, elle reste cependant insuffisante pour affirmer qu'il y a des cavités spécifiques dans les MIPs.

Pour ce faire, il est nécessaire de réaliser des extractions de type MISPE sur des échantillons réels pour vérifier que la molécule cible interagit uniquement avec les monomères fonctionnels présents dans la cavité. Cette interaction se doit d'être spécifique, c'est-à-dire de ne pas affecter les composés dans l'échantillon (ions, protéines, analogues de la molécule cible...).

Lors de la procédure d'extraction de la molécule cible, il est nécessaire d'éliminer toutes les interactions non spécifiques à la surface de la matrice du polymère. Pour ces raisons, il faut donc choisir un solvant pour l'étape de dépôt et/ou l'étape de lavage qui possède des caractéristiques chimiques permettant de rompre ces interactions non spécifiques. Cette

rupture doit s'effectuer sans affecter la rétention spécifique des molécules cibles à l'intérieur des cavités, correspondant à de plus fortes énergies de liaison (figure 1.30) (Pichon & Haupt, 2006).

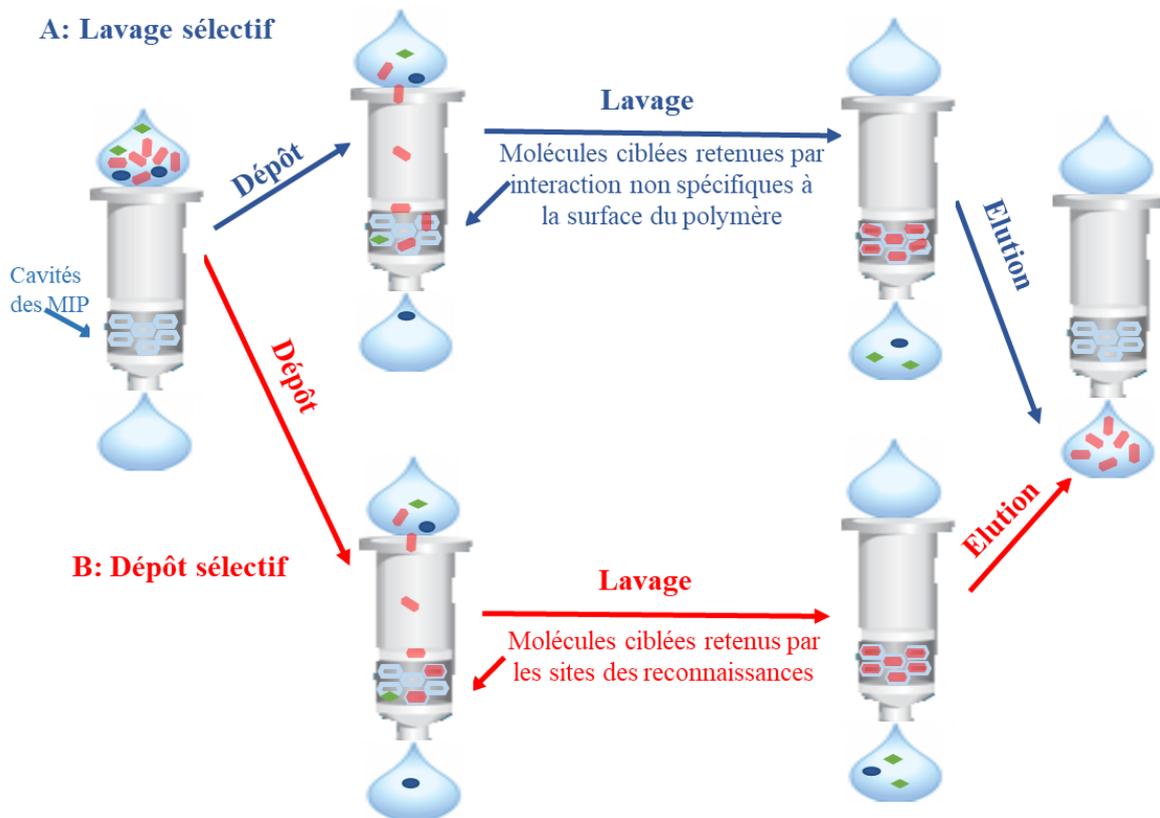


Figure 1.30. Dépôt (B) et lavage (A) sélectif obtenu lors de l'extraction solide-liquide sur MIP (adapté de la thèse de B. Claude, 2007).

➤ Etapes d'extraction en utilisant les MIPs

○ Etape de conditionnement :

Avant de déposer l'échantillon sur les MIPs ou les NIPs, il est nécessaire de faire percoler un ou des solvants pour éliminer les potentielles espèces interférentes et pour préparer les polymères à recevoir l'échantillon.

○ Etape de dépôt :

Les recherches montrent que les MIPs présentent une bonne sélectivité si le solvant de dépôt correspond au solvant utilisé lors de leur synthèse (Pichon, 2007) (Yoshizako *et al.*, 1998). Ce solvant doit être capable de favoriser les interactions spécifiques entre MIP et molécule cible dans les cavités (sites de reconnaissance) au travers de liaisons hydrogènes et/ou d'interactions électrostatiques (Garcia *et al.*, 2011).

Chapitre 1 : Etude bibliographique

○ Etape de lavage :

En général, le solvant de lavage est le même que celui utilisé lors de l'étape de dépôt. Parfois, il lui est ajouté un faible pourcentage de solvant polaire afin de limiter les interactions non spécifiques.

○ Etape d'élution :

Cette étape est réalisée en utilisant un solvant capable de rompre les interactions spécifiques entre les molécules cibles et les monomères fonctionnels des sites de reconnaissance.

En conclusion, il est important de sélectionner des solvants de dépôt et de lavage capables de favoriser les interactions spécifiques entre les sites de reconnaissance et les molécules cibles à l'intérieur des cavités et de limiter les interactions non spécifiques à l'extérieur des cavités. Pour évaluer ceci, il convient d'appliquer la procédure d'extraction sur MIPs et NIPs afin de comparer la différence de rétention de la molécule cible.

➤ **MIPs pour l'extraction des OP dans des matrices liquides**

Plusieurs MIPs ont été décrits dans la littérature pour extraire des organophosphorés de différentes matrices. Quelques publications sont analysées ci-après et les procédures d'extraction des OP relatives à ces différents MIPs sont résumées dans le tableau 1.4.

L'équipe de X. Zhu a synthétisé un MIP à partir de monocrotophos utilisé comme molécule empreinte, d'acide méthacrylique (MAA) utilisé comme monomère fonctionnel et d'éthylène glycol di méthacrylate (EGDMA) utilisé comme agent réticulant en ratio molaire 1/ 4/ 20. Le but de cette étude est d'extraire les quatre pesticides organophosphorés polaires suivants : le monocrotophos, le mevinphos, le phosphanidon, l'ométhoate, fortement solubles dans l'eau. Ces pesticides ont été étudiés dans un échantillon d'eau de rivière. Les meilleurs rendements d'extraction ont été obtenus par MISPE (rendements compris entre 79,3 et 93,5%) (Zhu *et al.*, 2005).

En 2007, afin d'extraire le diméthoate de feuilles de thé, Y. Lv et ses collaborateurs ont synthétisé différents MIPs à partir de 6 monomères fonctionnels (acide méthacrylique MAA, 4-vinylpyridine 4-VP, styrène, acétate vinyle, acrylamide et méthacrylate de méthyle MMA). Pour bien évaluer la force d'interaction entre le diméthoate et les six différents complexes polymériques, un processus de simulation informatique a été réalisée. Le calcul des énergies de liaison montre que trois des six polymères possèdent une forte affinité avec

Chapitre 1 : Etude bibliographique

le diméthoate. L'énergie de liaison du poly vinyl acétate est de -211,7 kJ / mol, celle du poly (MAA) et du poly (acétate de vinyle) de -210,3 kJ/ mol. Après une étude comparative expérimentale, le MMA a pourtant été retenu car il présentait le meilleur facteur d'impression. Le rendement d'extraction du diméthoate est de 99% pour des feuilles du thé contaminées à 0,8 mg/L de diméthoate (Lv *et al.*, 2007).

En 2008, le même groupe de chercheurs a souhaité améliorer le MIP pour le diméthoate en conservant les réactifs précédents dans un même ratio molaire mais en changeant de monomère fonctionnel. Au-delà du méthacrylate de méthyle MMA précédemment utilisé, les auteurs ont testé le méthacrylate de butyle (BMA) et le méthacrylate d'éthyle (EMA). Comme auparavant, la simulation informatique et l'étude de la capacité d'adsorption ont été réalisées et ces deux méthodes ont confirmé que le BMA conduisait au MIP le plus performant (Lv *et al.*, 2008).

Au sein de notre laboratoire, I. Bakas a synthétisé trois MIPs en utilisant les molécules empreintes suivantes : l'ométhoate (Bakas *et al.*, 2013b), le fenthion (Bakas *et al.*, 2014) et le méthidathion (Bakas *et al.*, 2012). Toutes ces synthèses font intervenir le même agent réticulant (EGDMA) et le même solvant porogène (DMF) mais diffèrent par le type de monomère fonctionnel (acide itaconique IA pour le diméthoate, acrylamide ACR pour le fenthion et N, N- méthylène bis acrylamide MBAA pour le methidathion). Cette étude avait pour objectif l'extraction sélective de ces pesticides par MISPE. Cette extraction a été réalisée à partir d'échantillons d'huile d'olive contaminés avec chacun des pesticides étudiés. Les rendements d'extraction de diméthoate dans l'huile d'olive contaminée à 0,05 ppm est voisin de 95 %, celui du fenthion dans l'huile d'olive contaminée à 0,023 ppm est de 96 % et celui du methidathion dans l'huile d'olive contaminée à 0,1 ppm du methidathion est de 88,5 %.

En 2017, Boulanouar et ses collaborateurs ont synthétisé un MIP à partir de la molécule empreinte monocrotophos, du monomère fonctionnel MAA et de l'agent réticulant EGDMA dans un ratio molaire 1/4/20. Le but de cette étude était d'extraire simultanément trois OPs (méthidathion, malathion et diazinon), de trois matrices huileuses (huile d'amande, huile d'olive et huile de tournesol). Dans le cas de l'huile d'amande, les auteurs ont comparé les rendements d'extraction des trois pesticides sur le MIP synthétisé, sur le NIP et sur C₁₈. Les résultats montrent notamment que l'effet de matrice sur MIP (de 7 à

Chapitre 1 : Etude bibliographique

11%) est deux à trois fois moins important que sur NIP et C18 (de 21 à 35%) (Boulanouar *et al.*, 2017).

Tableau 1.4. Méthodes d'extraction de différents organophosphorés sur MIPs.

Molécule cible	Conditionnement	Dépôt	Lavage	Elution	Référence
Monocrotophos, Mevinphos, Phosphamidon, Omethoate	1 mL MeOH 2 mL d'eau	1 mL d'eau de rivière.	2 mL ACN /DCM (5/95)	2 mL MeOH/DCM (10/90, v/v)	(Zhu <i>et al.</i> , 2005)
Dimethoate	-	10mg des feuilles de thé avec 600 mL d'hex dans système d'extraction micro-onde pendant 3min.	-	5 mL de THF (5% acide acétique)	(Lv <i>et al.</i> , 2007)
Dimethoate	10 mL hex.	1 g d'huile dans 10 mL hex.	5mL DCM /hex (15/85)	1mL MeOH	(Bakas <i>et al.</i> , 2013b)
Fenthion	2mL MeOH 1mL hex.	1g d'huile dans 10 mL hex.	5 mL DCM / ACN (15/85)	1 mL MeOH/TFA (98/2)	(Bakas <i>et al.</i> , 2014)
Methidathion	5 mL MeOH.	1 gr d'huile dans 10 mL l'hex.	DCM / hex (20/ 80), 5 mL	MeOH/ TFA (98/ 2) 1 mL	(Bakas <i>et al.</i> , 2012)
Methidathion, Malathion et Diazinon	4mL hex.	1 mL hex contaminé 1mg/L de chaque OP dans l'huile d'amande.	DCM / hex (5/ 95)	ACN 1 mL	(Boulanouar <i>et al.</i> , 2017)

DCM : dichlorométhane ; DMF : diméthyl formeamide ; THF : tétrahydrofurane ; ACN : acétonitrile ; MeOH : méthanol ; hex : hexane.

Dans ce paragraphe, nous avons présenté la diversité des supports d'extraction des organophosphorés à partir de matrices huileuses. Les supports classiques permettent d'extraire indifféremment plusieurs pesticides, alors que les supports de reconnaissance moléculaire, comme les MIPs, sont capables d'extraire spécifiquement un ou plusieurs organophosphorés. Les MIPs possèdent également l'avantage de limiter l'effet de matrice et conduisent donc à des teneurs en composés moins erronées.

1.2.6. Méthodes conventionnelles de détection des organophosphorés

Les pesticides organophosphorés peuvent être analysés par différentes méthodes chromatographiques appelées méthodes conventionnelles de détection.

a) Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG)

C'est une technique de séparation qui s'applique aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage, sans décomposition. Après séparation, les composés sont décelés à l'aide de différents types de détecteurs : ionisation de la flamme (FID), capture d'électrons (ECD), U.V. ou spectromètre de masse (MS) (Ma *et al.*, 2016). De nos jours, la CPG est applicable à environ 60 % des pesticides et de leurs métabolites disponibles sur le marché (Santos & Galceran, 2002).

b) Chromatographie en Phase Liquide (LPC)

C'est une technique de séparation et de quantification des constituants d'un mélange. Pour pouvoir être séparés, les solutés sont soumis à deux forces : une force d'entraînement exercée par la phase mobile et une force de rétention exercée par la phase stationnaire. Différents types de détecteurs peuvent être associés à la chromatographie liquide comme des détecteurs UV, à ionisation de flamme (FID), électrochimique (EDC) ou encore des spectromètres de masse (MS) (Ma *et al.*, 2016).

A titre d'exemple, une méthode d'analyse des résidus de pesticides dans l'huile d'olive par GC-MS et HPLC-MS a été développée (Barrek *et al.*, 2003). Les pesticides ont été séparés de la matrice huileuse par chromatographie d'exclusion. Les rendements d'extraction des pesticides dans les échantillons huileux étaient acceptables pour la plupart des pesticides entre 80% et 98% avec un écart type entre 4,6% et 12,9%, mais ils étaient moyens (phosmet 61,8%...) ou faibles (fenthion 3,3% et méthidathion 18,1%). Les pertes de rendement d'extraction pour le fenthion et le méthidathion pouvaient s'expliquer par leur volatilisation lors du processus de concentration de l'échantillon alors que les pertes pour d'autres pesticides comme phosmet étaient attribuées à la difficulté de séparation de la matrice huileuse. Après extraction, 20 pesticides pouvaient être analysés par chromatographie en phase gazeuse GC-MS et 11 autres par chromatographie liquide HPLC-MS. Dans cette étude, certains OP sont détectés par GC-MS (azinophos-ethyl, chlorpyrifos, diméthoate, fenthion, formotion, malathion, triazophos, phosmet, méthidathion, isofenphos) et d'autres, par HPLC (parathion, ométhoate, méthamidophos).

Une autre étude a également reporté une méthode d'analyse des résidus de pesticides dans l'huile d'olive par GC-MS et HPLC-MS (Ferrer *et al.*, 2005). Après extraction des OPs sur colonne de florisil, les OPs sont détectés soit par GC-MS (methyl-parathion, methylpirimiphos) soit par LC-MS (dimethoate). Ainsi, les chromatographies gazeuse et liquide peuvent être utilisées pour la détection des OPs extraits de l'huile.

1.2.7. Méthodes alternatives pour la détection des organophosphorés

Les pesticides organophosphorés peuvent également être analysés par des méthodes alternatives aux méthodes conventionnelles comme les biocapteurs enzymatiques, plus précisément les biocapteurs à acétylcholinestérase (Marty *et al.*, 1993). Par définition, les biocapteurs sont des outils analytiques constitués d'un élément biologique, doué de propriétés de reconnaissance moléculaire, étroitement couplé à un transducteur physique (optique, électrochimique, thermique...) capable de convertir le signal physico-chimique en un signal analogique (Thevenot *et al.*, 1999).

La détection de pesticides par des capteurs enzymatiques est généralement basée sur des mesures de la différence de l'activité de l'enzyme avant et après contact avec la molécule inhibitrice à analyser. La diminution de l'activité enzymatique est proportionnelle à la concentration de l'insecticide, ce qui permet leur quantification. Ces biocapteurs font généralement appel à un transducteur électrochimique avec une détection de type ampérométrique. Les méthodes ampérométriques sont basées sur la mesure du courant généré par l'oxydation ou la réduction d'une espèce électrochimique active, quand on travaille à un potentiel constant. Ce courant est directement proportionnel à la concentration de l'espèce détectée. Les capteurs à acétylcholinestérase ont été développés pour la détection de la plupart des insecticides organophosphorés (Skládal *et al.*, 1996 ; Trojanowicz & Hitchman, 1996 ; Marty *et al.*, 1995).

Pour obtenir un biocapteur à acétylcholinestérase plus stable, plus sensible et plus sélectif, il est possible de travailler avec des enzymes génétiquement modifiées. Le groupe de Didier Fournier a modifié génétiquement l'acétylcholinestérase pour obtenir une enzyme 300 fois plus sensible aux organophosphorés que l'enzyme native (non modifiée) (Fournier *et al.*, 1992), (Estrada-Mondaca & Fournier, 1998), (Boublik *et al.*, 2002), plus stable *in vitro* et résistante à différents agents de dénaturation.

Chapitre 1 : Etude bibliographique

Bien que le capteur à acétylcholinestérase permette de détecter spécifiquement les organophosphorés, il ne permet pas de faire une discrimination entre eux. Dans notre laboratoire, Ben Oujji a utilisé un capteur à acétylcholinestérase génétiquement modifiée pour détecter les pesticides extraits d'une huile d'olive contaminée par du malathion, du méthidathion, du diméthoate, ou un mélange de ces trois substances. Les extractions ont été réalisées sur des MIPs spécifiques à chacun de ces trois composés. Les résultats indiquent que les MIPs pour l'extraction du diméthoate et du méthidathion sont spécifiques alors que le MIP pour l'extraction du malathion ne l'est pas puisqu'il permet d'extraire indifféremment les 3 composés. Par ailleurs, le biocapteur développé était très performant puisque, dans le cas du malathion et du méthidathion, il permettait d'atteindre des limites de détection de l'ordre du ppb, soit 500 fois plus basses que les LMR (Ben Oujji *et al.*, 2014).

Ainsi, les méthodes analytiques existantes sont suffisamment performantes pour la détection des OPs dans les matrices alimentaires mais dans le cas plus particulier des matrices grasses, c'est la procédure d'extraction de ces composés qui est une étape clé.

Références chapitre 1 : Etude bibliographique

- Alexander, C., Andersson, H. S., Andersson, L. I., Ansell, R. J., Kirsch, N., Nicholls, I. A., O'Mahony, J. & Whitcombe, M. J. (2006). Molecular imprinting science and technology: A survey of the literature for the years up to and including 2003. *Journal of Molecular Recognition*, 19(2), pp 106–180.
- Alizadeh, T. & Akhoundian, M. (2010). Promethazine determination in plasma samples by using carbon paste electrode modified with molecularly imprinted polymer (MIP): Coupling of extraction, preconcentration and electrochemical determination. *Electrochimica Acta*, 55(20), pp 5867–5873.
- Amvrazi, E. G. & Albanis, T. A. (2006). Multiresidue Method for Determination of 35 Pesticides in Virgin Olive Oil by Using Liquid – Liquid Extraction Techniques Coupled with Solid-Phase Extraction Clean Up and Gas Chromatography with Nitrogen Phosphorus Detection and Electron Capture Detection. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54, pp 9642–9651.
- Andersson, H. S., Karlsson, J. G., Piletsky, S. A., Koch-Schmidt, A.-C., Mosbach, K. & Nicholls, I. A. (1999). Study of the nature of recognition in molecularly imprinted polymers, II [1] Influence of monomer–template ratio and sample load on retention and selectivity Hakan. *Journal of Chromatography A*, 848, pp 39–49.
- Andreescu, S. (2002). Biocapteurs à acétylcholinestérase pour la détection sensible et spécifique des insecticides organophosphorés. Diss. Perpignan.
- Arshady, R. & Mosbach, K. (1981). Synthesis of substrate-selective polymers by host-guest polymerization. *Makromol. Chem.*, 182(2), pp 687–692.
- Artaud, M. (2008). l'olivier.
- Baggiani, C., Trotta, F., Giraudi, G., Giovannoli, C. & Vanni, A. (1999). A molecularly imprinted polymer for the pesticide bentazone. *Analytical Communications*, 36(7), pp 263–266.
- Bakas, I., Ben Oujji, N., Istamboulié, G., Piletsky, S., Piletska, E., Ait-Addi, E., Ait-Ichou, I., Noguer, T. & Rouillon, R. (2014). Molecularly imprinted polymer cartridges coupled to high performance liquid chromatography (HPLC-UV) for simple and rapid analysis of fenthion in olive oil. *Talanta*, 125, pp 313–318 Elsevier.
- Bakas, I., Oujji, N. Ben, Moczko, E., Istamboulie, G., Piletsky, S., Piletska, E., Ait-Addi, E., Ait-Ichou, I., Noguer, T. & Rouillon, R. (2013). Computational and experimental investigation of molecular imprinted polymers for selective extraction of dimethoate and its metabolite omethoate from olive oil. *Journal of Chromatography A*, 1274, pp 13–18.
- Bakas, I., Ben Oujji, N., Moczko, E., Istamboulie, G., Piletsky, S., Piletska, E., Ait-Ichou, I., Ait-Addi, E., Noguer, T. & Rouillon, R. (2012). Molecular imprinting solid phase extraction for selective detection of methidathion in olive oil. *Analytica Chimica Acta*, 734, pp 99–105.
- Barrek, S., Paise, O. & Grenier-Loustalot, M.-F. (2003). Determination of residual pesticides in olive oil by GC–MS and HPLC–MS after extraction by size-exclusion chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 376(3), pp 355–359.
- Bastide, J., Cambon, J. P., Breton, F., Piletsky, S. A. & Rouillon, R. (2005). The use of molecularly imprinted polymers for extraction of sulfonylurea herbicides. *Analytica Chimica Acta*, 542, pp 97–103.
- Batra, D. & Shea, K. J. (2003). Novel Trifunctional Building Blocks for Fluorescent Polymers. *American Chemical Society*, 5(21), pp 3895–3898.

Chapitre 1 : Etude bibliographique

- Baydemir, G., Bereli, N., Andac, M., Say, R., Galaev, I. Y. & Denizli, A. (2009). Bilirubin recognition via molecularly imprinted supermacroporous cryogels. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 68, pp 33–38.
- Beach, J. V. & Shea, K. J. (1994). Designed Catalysts. A Synthetic Network Polymer That Catalyzes the Dehydrofluorination of 4-Fluoro-4-(p-nitrophenyl) butan-2-one. *Journal American Chemical Society*, 116(1), pp 379–380.
- Beltran, A., Borrull, F., Cormack, P. A. G. & Marcé, R. M. (2011). Molecularly imprinted polymer with high-fidelity binding sites for the selective extraction of barbiturates from human urine. *Journal of chromatography. A*, 1218(29), pp 4612–8.
- Beltran, A., Borrull, F., Marcé, R. M. & Cormack, P. A. G. (2010). Molecularly-imprinted polymers: useful sorbents for selective extractions. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 29(11), pp 1363–1375.
- Bitar, M., Maalouly, J., Chebib, H., Lerbret, A., Cayot, P. & Bou-Maroun, E. (2015). Experimental design approach in the synthesis of molecularly imprinted polymers specific for iprodione fungicide. *Reactive and Functional Polymers*, 94, pp 17–24.
- Boublik, Y., Saint-Aguet, P., Lougarre, A., Arnaud, M., Villatte, F., Estrada-Mondaca, S. & Fournier, D. (2002). Acetylcholinesterase engineering for detection of insecticide residues. *Protein Engineering*, 15(1), pp 43–50.
- Boulanouar, S., Combès, A., Mezzache, S. & Pichon, V. (2017). Synthesis and application of molecularly imprinted polymers for the selective extraction of organophosphorus pesticides from vegetable oils. *Journal of Chromatography A*, 1513, pp 59–68.
- Breton, F., Delépée, R. & Agrofoglio, L. A. (2009). Molecular imprinting of AMP by an ionic-noncovalent dual approach. *Journal of Separation Science*, 32(19), pp 3285–3291.
- Bunte, G., Hürtlen, J., Pontius, H., Hartlieb, K. & Krause, H. (2007). Gas phase detection of explosives such as 2,4,6-trinitrotoluene by molecularly imprinted polymers. *Analytica Chimica Acta*, 591(1), pp 49–56.
- Cederfur, J., Pei, Y., Zihui, M. & Kempe, M. (2003). Synthesis and screening of a molecularly imprinted polymer library targeted for penicillin G. *Journal of Combinatorial Chemistry*, 5(1), pp 67–72.
- Çetin, K. & Denizli, A. (2015). 5-Fluorouracil delivery from metal-ion mediated molecularly imprinted cryogel discs. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 126, pp 401–406.
- Chapuis, F., Pichon, V. & Hennion, M. C. (2005). Méthode de préconcentration par extraction en phase solide : principe et application aux industries environnementales et pétrolières. *oil & Gas Science and Technology*, 60(6), pp 899–912.
- Chen, L., Wang, X., Lu, W., Wu, X. & Li, J. (2016). Molecular imprinting: perspectives and applications. *The Royal Society of Chemistry*, 45(8), pp 2137–2211 Royal Society of Chemistry.
- Chen, L., Xu, S. & Li, J. (2011). Recent advances in molecular imprinting technology: current status, challenges and highlighted applications. *Chemical Society Reviews*, 40(5), pp 2922–2942.
- Claude, B. (2007). 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. Diss. Université d'Orléans.

Chapitre 1 : Etude bibliographique

- Colovic, M. B., Krstic, D. Z., Lazarevic-Pasti, T. D., Bondzic, A. M. & Vasic, V. M. (2013). Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. *Current Neuropharmacology*, 11(3), pp 315–335.
- Cormack, P. A. G. & Elorza, A. Z. (2004). Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterisation. *Journal of Chromatography B*, 804(1), pp 173–182.
- Costa, L. G. (2006). Current issues in organophosphate toxicology. *Clinica Chimica Acta*, 366(1–2), pp 1–13.
- Cunha, S. C., Fernandes, O., Beatriz, M. & Oliveira, P. P. (2007). Determination of phosmet and its metabolites in olives by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography – mass spectrometry. *talanta*, 73(514–522), pp 514–522.
- Cunha, S. C., Steven, J., Mastovska, K., Fernandes, J. O. & Oliveira, M. B. P. P. (2010). Sample Preparation Approaches for the Analysis of Pesticide Residues in Olives and Olive Oils. (Chapter 70), pp 653–666.
- Dong, H., Tong, A.-J. & Li, L. (2003). Syntheses of steroid-based molecularly imprinted polymers and their molecular recognition study with spectrometric detection. *Spectrochimica Acta A*, 59(2), pp 279–284.
- Dugo, G., Di Bella, G., Torre, L. L. & Saitta, M. (2005). Rapid GC-FPD determination of organophosphorus pesticide residues in Sicilian and Apulian olive oil. *Food Control*, 16, pp 435–438.
- Dvir, H., Silman, I., Harel, M., Rosenberry, T. L. & Sussman, J. L. (2010). Acetylcholinesterase: From 3D Structure to Function. *Chem Biol Interact*, 187(1–3), pp 10–22.
- Esfandyari-Manesh, M., Javanbakht, M., Atyabi, F., Badiei, A. & Dinarvand, R. (2011). Effect of porogenic solvent on the morphology, recognition and release properties of carbamazepine-molecularly imprinted polymer nanospheres. *Journal of Applied Polymer Science*, 121(2), pp 1118–1126.
- Estrada-Mondaca, S. & Fournier, D. (1998). Stabilization of Recombinant *Drosophila* Acetylcholinesterase. *Protein Expression and Purification*, 12(2), pp 166–172.
- EU Pesticides database - European Commission.
- Feás, X., Fente, C. A., Hosseini, S. V., Seijas, J. A., Vázquez, B. I., Franco, C. M. & Cepeda, A. (2009). Use of acrylic acid in the synthesis of molecularly imprinted polymers for the analysis of cyproheptadine. *Materials Science and Engineering C*, 29(2), pp 398–404 Elsevier B.V.
- Ferrer, C., Gómez, M. J., García-Reyes, J. F., Ferrer, I., Thurman, E. M. & Fernández-Alba, A. R. (2005). Determination of pesticide residues in olives and olive oil by matrix solid-phase dispersion followed by gas chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1069(2), pp 183–194.
- Food, E. & Authority, S. (2012). Modification of the existing MRLs for phosmet in various crops 1. *efsa journal* 2012.
- Fournier, D., Mutero, A. & Rungger, D. (1992). *Drosophila* acetylcholinesterase Expression of a functional precursor in *Xenopus* oocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 203, pp 513–519.

Chapitre 1 : Etude bibliographique

- Fu, Q., Sanbe, H., Kagawa, C., Kunimoto, K. & Haginaka, J. (2003). Uniformly Sized Molecularly Imprinted Polymer for (S) -Nilvadipine . Comparison of Chiral Recognition Ability with HPLC Chiral Stationary Phases Based. *Analytical Chemistry*, 75(2), pp 191–198.
- Fu, X., Yang, Q., Zhou, Q., Lin, Q. & Wang, C. (2015). Template-Monomer Interaction in Molecular Imprinting: Is the Strongest the Best? *Open Journal of Organic Polymer Materials*, 5(5), pp 58–68.
- Garcia-Reyes, J. F., Ferrer, C., Gomez-Ramos, M. J., Molina-diaz, A. & Fernandez-Alba, A. R. (2007). Determination of pesticide residues in olive oil and olives. *analytical chemistry*, 26(3), pp 239–251.
- Garcia, R., Cabrita, M. J. & Costa Freitas, A. M. (2011). Application of Molecularly Imprinted Polymers for the Analysis of Pesticide Residues in Food—A Highly Selective and Innovative Approach. *American Journal of Analytical Chemistry*, 2(8), pp 16–25.
- Gellman, S. H. (1997). Introduction : Molecular Recognition. *Chemical Reviews*, 97(5), pp 1231–1232.
- Gibney, G., Camp, S., Dionne, M., MacPhee-Quigley, K. & Taylor, P. (1990). Mutagenesis of essential functional residues in acetylcholinesterase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(19), pp 7546–7550.
- Gilbert-lópez, B., García-reyes, J. F. & Molina-díaz, A. (2009). Talanta Sample treatment and determination of pesticide residues in fatty vegetable matrices : A review. 79, pp 109–128.
- Gimeno, E., Fito, M., Lamuela-Raventos, R., Castellote, A., Covas, M., Farré, M., Torre-Boronat, M. de la & Lopez-Sabater, M. (2002). Effect of ingestion of virgin olive oil on human low-density lipoprotein composition. *European Journal of Clinical Nutrition*, 56, pp 114–120.
- Global MRL Database - Home.
- Guiñazú, N., Rena, V., Genti-Raimondi, S., Rivero, V. & Magnarelli, G. (2012). Effects of the organophosphate insecticides phosmet and chlorpyrifos on trophoblast JEG-3 cell death, proliferation and inflammatory molecule production. *Toxicology in Vitro*, 26(3), pp 406–413.
- Hage, D. S. (1998). Survey of recent advances in analytical applications of immunoaffinity chromatography. *Journal of chromatography. B*, 715(1), pp 3–28.
- Haginaka, J. (2008). Monodispersed, molecularly imprinted polymers as affinity-based chromatography media. *Journal of Chromatography B*, 866(1–2), pp 3–13.
- Hamaide, T., Fontaine, L. & six, J.-L. (2014). *Chimie des polymères*. 2e édition. Paris: lavoisier. ISBN 978-2-7430-1557-2.
- Harel, M., Schalkt, I., Ehret-Sabatiert, L., Bouett, F., Goeldnert, M., Hirtht, C., Axelsen, P. H., Silmanii, I. & Sussman, J. L. (1993). Quaternary ligand binding to aromatic residues in the active-site gorge of acetylcholinesterase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90, pp 9031–9035.
- Haupt, K. & Mosbach, K. (1998). Plastic antibodies: developments and applications. *Trends in Biotechnology*, 16(11), pp 468–475.
- Hoshino, Y., Koide, H., Urakami, T., Kanazawa, H., Kodama, T., Oku, N. & Shea, K. J. (2010). Recognition, neutralization and clearance of target peptides in the blood stream of living mice by molecular imprinted polymer nanoparticles: a plastic antibody. *Journal American Chemical Society*, 132(19), pp 6644–6645.

Chapitre 1 : Etude bibliographique

- Huang, B. Y., Chen, Y. C., Wang, G. R. & Liu, C. Y. (2011). Preparation and evaluation of a monolithic molecularly imprinted polymer for the chiral separation of neurotransmitters and their analogues by capillary electrochromatography. *Journal of Chromatography A*, 1218(6), pp 849–855.
- IOOC 2016. No Title. (International Olive Oil Council (IOOC) (2016). Disponible à partir de : <http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/131-world-olive-oil-figures>. accessed June 2016.).
- Kataoka, H., Lord, H. L. & Pawliszyn, J. (2000). Applications of solid-phase microextraction in food analysis. *Journal of Chromatography A*, 880, pp 35–62.
- Kempe, M. (1996). Antibody-Mimicking Polymers as Chiral Stationary Phases in HPLC. *Analytical Chemistry*, 68(11), pp 1948–1953.
- Kugimiya, A. & Takeuchi, T. (2002). Molecular recognition by indoleacetic acid-imprinted polymers - effects of 2-hydroxyethyl methacrylate content. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 372(2), pp 305–307.
- Lanza, F., Hall, A. J., Sellergren, B., Berezki, A., Horvai, G., Bayouhd, S., Cormack, P. A. G. & Sherrington, D. C. (2001). Development of a semiautomated procedure for the synthesis and evaluation of molecularly imprinted polymers applied to the search for functional monomers for phenytoin and nifedipine. *Analytica Chimica Acta*, 435(1), pp 91–106.
- Lok, C. M. & Son, R. (2009). Application of molecularly imprinted polymers in food sample analysis – a perspective. *International Food Research Journal*, 16, pp 127–140.
- Lordel, S. (2011). Synthèse et caractérisation de polymères à empreintes moléculaires pour l' ” extraction sélective de résidus d' ” explosifs pour le développement de dispositifs de terrain. HAL archives-ouvertes.fr.
- Lorenzo, R. A., Carro, A. M., Alvarez-Lorenzo, C. & Concheiro, A. (2011). To remove or not to remove? The challenge of extracting the template to make the cavities available in molecularly imprinted polymers (MIPs). *International Journal of Molecular Sciences*, 12(7), pp 4327–4346.
- Lu, Y., Li, C., Wang, X., Sun, P. & Xing, X. (2004). Influence of polymerization temperature on the molecular recognition of imprinted polymers. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 804(1), pp 53–59.
- Lukaszewicz-Hussain, A. (2010). Role of oxidative stress in organophosphate insecticide toxicity - Short review. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 98(2), pp 145–150.
- Luliński, P. (2017). Molecularly imprinted polymers based drug delivery devices: a way to application in modern pharmacotherapy. A review. *Materials Science and Engineering: C*, 76, pp 1344-1353.
- Luliński, P., Dana, M. & Maciejewska, D. (2014). Synthesis and characterization of 4-(2-aminoethyl) aniline imprinted polymer as a highly effective sorbent of dopamine. *Talanta*, 119, pp 623–631.
- Lv, Y., Lin, Z., Feng, W., Zhou, X. & Tan, T. (2007). Selective recognition and large enrichment of dimethoate from tea leaves by molecularly imprinted polymers. *Biochemical Engineering Journal*, 36(3), pp 221–229.
- Lv, Y., Lin, Z., Tan, T., Feng, W., Qin, P. & Li, C. (2008). Application of molecular dynamics modelling for the prediction of selective adsorption properties of dimethoate imprinting polymer. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 133(1), pp 15–23.

Chapitre 1 : Etude bibliographique

- Ma, F., Wu, R., Li, P. & Yu, L. (2016). Analytical approaches for measuring pesticides, mycotoxins and heavy metals in vegetable oils: A review. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 118(3), pp 339–352.
- Mane, S., Ponrathnam, S. & Chavan, N. (2015). Effect of Chemical Cross-linking on Properties of Polymer Microbeads: A Review. *Canadian Chemical Transactions Year*, 3(4), pp 473–485.
- Marcel, V., Palacios, L. G., Pertuy, C., Masson, P. & Fournier, D. (1998). Two invertebrate acetylcholinesterases show activation followed by inhibition with substrate concentration. *Biochemical Journal*, 329, pp 329–334.
- Marty, J.-L., Mionetto, N., Noguer, T., Ortega, F. & Roux, C. (1993). Enzyme sensors for the detection pesticides. *Biosensors and Bioelectronics*, 8, pp 273–280.
- Marty, J., Garcia, D. & Rouillon, R. (1995). Biosensors : potential in pesticide detection. *Trends in analytical chemistry*, 14(7), pp 329–333.
- Matsui, J., Doblhoff-dier, O. & Takeuchi, T. (1997). 2- (Trifluoromethyl) acrylic acid : a novel functional monomer in non-covalent molecular imprinting. *Analytica Chimica Acta*, 343, pp 1–4.
- Mayes, A. G. & Mosbach, K. (1996). Molecularly Imprinted Polymer Beads: Suspension Polymerization Using a Liquid Perfluorocarbon as the Dispersing Phase. *Analytical Chemistry* [online], 68(21), pp 3769–3774. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac960363a>.
- Mertz, E., Beil, J. B. & Zimmerman, S. C. (2003). Kinetics and Thermodynamics of Amine and Diamine Signaling by a Trifluoroacetyl Azobenzene Reporter Group. 5 (17), pp 3127–3130.
- Odian, G. (2004). Radical Chain Polymerization. Principles of Polymerization. pp 198–349. John Wiley & Sons, Inc. ISBN 978-0-471-47875-1.
- Oral, E. & Peppas, N. A. (2004). Dynamic studies of molecular imprinting polymerizations. *Polymer*, 45(18), pp 6163–6173.
- Ben Oujji, N., Idriss, B., Istamboulie, G., Ihya, A. chou, Elhabib, A. addi, Régis, R. & Thierry, N. (2014). Enzymatic biosensor associated with Molecularly Imprinted Polymers for sensitive and selective detection of organophosphorus insecticides in olive oil. *Science innovation*, 2, pp 1–6.
- Özcan, L., Sahin, M. & Sahin, Y. (2008). Electrochemical Preparation of a Molecularly Imprinted Polypyrrole-modified Pencil Graphite Electrode for Determination of Ascorbic Acid. *Sensors*, 8(9), pp 5792–5805.
- Pardeshi, S. & Singh, S. K. (2016). Precipitation polymerization: a versatile tool for preparing molecularly imprinted polymer beads for chromatography applications. *RSC Advance*. 6(28), pp 23525–23536.
- Pérez-Moral, N. & Mayes, A. G. (2004). Comparative study of imprinted polymer particles prepared by different polymerisation methods. *Analytica Chimica Acta*, 504(1), pp 15–21.
- Pichon, V. (2006). Extraction sur phase solide pour l'analyse de composés organiques Extraction sur phase solide pour l'analyse de composés organiques. 33(0).
- Pichon, V. (2007). Selective sample treatment using molecularly imprinted polymers. *Journal of Chromatography A*, 1152(1–2), pp 41–53.

Chapitre 1 : Etude bibliographique

- Pichon, V. & Chapuis-Hugon, F. (2008). Role of molecularly imprinted polymers for selective determination of environmental pollutants—A review. *Analytica Chimica Acta*, 622(1–2), pp 48–61.
- Pichon, V. & Haupt, K. (2006). Affinity Separations on Molecularly Imprinted Polymers with Special Emphasis on Solid-Phase Extraction. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 29(7–8), pp 989–1023.
- Piletska, E. V., Romero-Guerra, M., Chianella, I., Karim, K., Turner, A. P. F. & Piletsky, S. A. (2005). Towards the development of multisensor for drugs of abuse based on molecular imprinted polymers. *Analytica Chimica Acta*, 542(1), pp 111–117.
- Piletsky, S. A., Karim, K., Piletska, E. V., Day, C. J., Freebairn, K. W., Legge, C. & Turner, A. P. F. (2001). Recognition of ephedrine enantiomers by molecularly imprinted polymers designed using a computational approach. *The Journal of Analyst*, 126(10), pp 1826–1830.
- Polyakov, M. V. (1931). Adsorption properties and structure of silica gel. *Zhurnal Fizieskoj Khimii/Akademiya SSSR*, 2, pp 799–805.
- de Potás, G. M. & de D'Angelo, A. M. P. (1993). Phosphoinositide phosphorylation and shape changes produced by phosmet-oxon in human erythrocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 106(2), pp 561–566.
- Psillakis, E. & Kalogerakis, N. (2003). Developments in liquid-phase microextraction. 22 (10).
- Purdey, M. (1998). High-dose exposure to systemic phosmet insecticide modifies the phosphatidylinositol anchor on the prion protein: The origins of new variant transmissible spongiform encephalopathies. *Medical Hypotheses*, 50(2), pp 91–111.
- Quinn, D. M. (1987). Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states. *Chemical Reviews*, 87(5), pp 955–979.
- Rajkumar, R., Warsinke, A., Möhwald, H., Scheller, F. W. & Katterle, M. (2007). Development of fructosyl valine binding polymers by covalent imprinting. *Biosensors and Bioelectronics*, 22(12), pp 3318–3325.
- Ramstroem, O., Andersson, L. I. & Mosbach, K. (1993). Recognition sites incorporating both pyridinyl and carboxy functionalities prepared by molecular imprinting. *The Journal of Organic Chemistry*, 58(26), pp 7562–7564.
- Recognition and Management of Pesticide Poisonings: Sixth Edition: 2013.
- Sambe, H., Hoshina, K., Moaddel, R., Wainer, I. W. & Haginaka, J. (2006). Uniformly sized, molecularly imprinted polymers for nicotine by precipitation polymerization. *Journal of Chromatography A*, 1134(1–2), pp 88–94.
- Sanbe, H. & Haginaka, J. (2002). Uniformly sized molecularly imprinted polymers for bisphenol A and b-estradiol: retention and molecular recognition properties in hydro-organic mobile phases. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 30, pp 1835–1844.
- Sanson, B. (2009). La dynamique structurale de l'acétylcholinestérase : étude réalisée par cristallographie aux rayons X et une méthode spectroscopique complémentaire.. Diss. Université Joseph-Fourier - Grenoble I.
- Santos, F. J. & Galceran, M. T. (2002). The application of gas chromatography to environmental analysis. *Trends in analytical chemistry*, 21(2), pp 672–685.

Chapitre 1 : Etude bibliographique

- Sarhan, A. (1982). Racemattrennung der Mandelsäure a Polymeren mit chiralen als Haftgruppe. *Makromol. Chem.*, 3, pp 489–493.
- Sellergren, B. (1990). Molecular Recognition in Macroporous Polymers Prepared by a Substrate Analogue Imprinting Strategy. *American Chemical Society*, 55, pp 3383–3386.
- Sellergren, B. (1999). Polymer- and template-related factors influencing the efficiency in molecularly imprinted solid-phase extractions. *Analytical chemistry*, 18(3), pp 164–174.
- Sellergren, B. & Allender, C. J. (2005). Molecularly imprinted polymers: A bridge to advanced drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(12), pp 1733–1741.
- Sellergren, B. & Shea, K. J. (1993). Chiral ion-exchange chromatography Correlation between solute retention and a theoretical ion exchange model using imprinted polymers. *Journal of Chromatography A*, 654, pp 17–28.
- Sellergren, B., Wieschemeyer, J., Boos, K.-S. & Seidel, D. (1998). Imprinted Polymers for Selective Adsorption of Cholesterol from Gastrointestinal Fluids. *Chemistry of Materials*, 10(12), pp 4037–4046.
- Shafferman, A., Kronman, C., Flashner, Y., Leitner, M., Grosfeld, H., Ordentlich, A., Gaze, Y., Cohen, Ariel, N., Barak, D., Harel, M., Silman, I., Sussman, J. L. & Velan, B. (1992). Mutagenesis of Human Acetylcholinesterase. *Journal of Biological Chemistry*, 267, pp 17640–17648.
- Shea, K. J. & Dougherty, T. K. (1986). Molecular Recognition on Synthetic Amorphous Surfaces. The Influence of Functional Group Positioning on the Effectiveness of Molecular Recognition. *Journal American Chemical Society*, 108, pp 1091–1093.
- Silman, I. & Sussman, J. L. (2005). Acetylcholinesterase: ‘classical’ and ‘non-classical’ functions and pharmacology. *Current Opinion in Pharmacology*, 5(3), pp 293–302.
- Skládal, P., Fiala, M. & Krejčí, J. (1996). International Journal of Detection of Pesticides in the Environment Using Biosensors Based on Cholinesterases. *International journal of environmental analytical chemistry*, 65, pp 139–148.
- Spivak, D. A. & Shea, K. J. (1998). Binding of Nucleotide Bases by Imprinted Polymers. *Macromolecules*, 31(7), pp 2160–2165.
- Spivak, D., Gilmore, M. A. & Shea, K. J. (1997). Evaluation of binding and origins of specificity of 9-ethyladenine imprinted polymers. *Journal of the American Chemical Society*, 119(19), pp 4388–4393.
- Sreenivasan, K. (1999). On the Application of Molecularly Imprinted Poly (HEMA) as a Template Responsive Release System. *Journal of applied Polymer Science*, 71, pp 1819–1821.
- Sussman, J., Harel, M., Frolow, F., Oefner, C., Goldman, A., Toker, L. & Silman, I. (1991). Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science*, 253(5022), pp 872–879.
- Tabassi, S. A. S., Hashemi, S. V. & Mohajeri, S. A. (2013). Dummy template molecularly imprinted polymer for omeprazole and the study of its drug binding and release properties. *Journal of Applied Polymer Science*, 130(6), pp 4165–4170.
- Takagishi, T. & Klotz, I. M. (1972). Macromolecule-small molecule interactions; introduction of additional binding sites in polyethyleneimine by disulfide cross-linkages. *Biopolymers*, 11(2), pp 483–491.

Chapitre 1 : Etude bibliographique

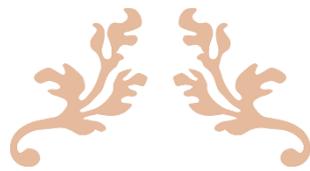
- Tehfe, M. A., Louradour, F., Lalevée, J. & Fouassier, J.-P. (2013). Photopolymerization Reactions: On the Way to a Green and Sustainable Chemistry. *Applied Sciences*, 3(2), pp 490–514.
- Thevenot, D., Toth, K., Durst, R., Wilson, G., Thevenot, D., Toth, K., Durst, R. & Wilson, G. (1999). Electrochemical biosensors. *Pure and Applied Chemistry*, 71(12), p 2333-2348.
- Trojanowicz, M. & Hitchman, M. L. (1996). Determination of pesticides using electrochemical biosensors. *Trends in analytical chemistry*, 15(1), pp 38–45.
- Tsoutsis, C. S. & Albanis, T. A. (2004). International Journal of Environmental Optimization of headspace solid-phase microextraction conditions for the determination of organophosphorus insecticides in olive oil. *International journal of environmental analytical chemistry*, 84(1-3), pp 3–13.
- Tunc, Y., Hasirci, N., Yesilada, A. & Ulubayram, K. (2006). Comonomer effects on binding performances and morphology of acrylate-based imprinted polymers. *Polymer*, 47(20), pp 6931–6940.
- US EPA - Pesticides - Reregistration Eligibility Decision for Propetamphos.
- Vasapollo, G., Sole, R. Del, Mergola, L., Lazzoi, M. R., Scardino, A., Scorrano, S. & Mele, G. (2011). Molecularly Imprinted Polymers: Present and Future Prospective. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(12), pp 5908–5945.
- Vidyasankar, S., Ru, M. & Arnold, F. H. (1997). Molecularly imprinted ligand-exchange adsorbents for the chiral separation of underivatized amino acids. *Chromatography A*, 775, pp 51–63.
- Walters, S. M. (1990). Clean-up techniques for pesticides in fatty foods. *Analytica Chimica Acta*, 236(236), pp 77–82.
- Whitcombe, M. J., Kirsch, N. & Nicholls, I. A. (2014). Molecular imprinting science and technology: A survey of the literature for the years 2004-2011. *Journal of Molecular Recognition*. ISBN 1021502000885.
- Whitcombe, M. J., Rodriguez, M. E., Villar, P. & Vulfson, E. N. (1995). A New Method for the Introduction of Recognition Site Functionality into Polymers Prepared by Molecular Imprinting: Synthesis and Characterization of Polymeric Receptors for Cholesterol. *Journal of the American Chemical Society*, 117(27), pp 7105–7111.
- Worek, F., Thiermann, H., Szinicz, L. & Eyer, P. (2004). Kinetic analysis of interactions between human acetylcholinesterase, structurally different organophosphorus compounds and oximes. *Biochemical Pharmacology*, 68(11), pp 2237–2248.
- Wulff, G. (2002). Enzyme-like Catalysis by Molecularly Imprinted Polymers. *Chemical Reviews*, 102(1), pp 1–26.
- Wulff, G., Best, W. & Akelah, A. (1984). Enzyme-analogue built polymers, 17 investigations on the racemic resolution of amino acids gunter. *Reactive Polymers, Ions exchangers, Solvents*, 2, pp 167–174.
- Wulff, G., Cimpel, J., Feld, J. & Hufnagel, I. (1982). Uber enzymanalog gebaute Polymere, 15. *Makromol. Chem.*, 183, pp 2459–2467.
- Wulff, G. & Haarer, J. (1991). The preparation of defined chiral cavities for the racemic resolution of free sugars. *Makromol. Chem.*, 192, pp 1329–1338.

Chapitre 1 : Etude bibliographique

- Wulff, G., Heide, B. & Helfmeier, G. (1986). Molecular Recognition through the Exact Placement of Functional Groups on Rigid Matrices via a Template Approach. *American Chemical Society*, 108(5), pp 1089–1091.
- Wulff, G., Sarhan, A. & Zabroki, K. (1973). Enzyme - analogue built polymers and their use for the resolution of racemates. *Tetrahedron Letters*, (44), pp 4329–4332.
- Wulff, G., Schulze, I., Zabrocki, K. & Vesper, W. (1980). Uber enzymanalog gebaute Polymere, IIa) 531 Bindungsstellen im Polymer mit unterschiedlicher Zahl der Haftgruppen. *Makromol. Chem.*, 181(3), pp 531–544.
- Wulff, G., Vesper, W., Grobe-Einsler, R. & Sarhan, A. (1977). Enzyme-Analogue Built Polymers, 4 on the Synthesis of Polymers Containing Chiral Cavities and Their Use for the Resolution of Racemates G. *Makromol. Chem.*, 178, pp 2799–2816.
- Wulff, G. & Vietmeier, J. (1989a). Enzyme-analogue built polymers, 25 a Synthesis of macroporous copolymers from α -amino acid based vinyl compounds Gunter. *Makromol. Chem.*, 190, pp 1717–1726.
- Wulff, G. & Vietmeier, J. (1989b). Enzyme-analogue built polymers, 26 Enantioselective synthesis of amino acids using polymers possessing chiral cavities obtained by an imprinting procedure with template molecules. *Makromol. Chem.*, 190, pp 1727–1735.
- Wulff, G., Vietmeier, J. & Poll, H.-G. (1987). Influence of the nature of the cross-linking agent on the performance of imprinted polymers in racemic-resolution. *Makromolekulare chemie*, 188, pp 731–740.
- Xie, J., Zhu, L. & Xu, X. (2002). Affinitive separation and on-line identification of antitumor components from *Peganum nigellastrum* by coupling a chromatographic column of target analogue imprinted polymer with mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 74(10), pp 2352–2360.
- Yagüe, C., Bayarri, S., Conchello, P., Lázaro, R., Pérez-Arquillué, C., Herrera, A. & Ariño, A. (2005). Determination of Pesticides and PCBs in Virgin Olive Oil by Multicolumn Solid-Phase Extraction Cleanup Followed by GC-NPD/ECD and Confirmation by Ion-Trap GC-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(13), pp 5105–5109.
- Yan, H. & Ho Row, K. (2006). Characteristic and Synthetic Approach of Molecularly Imprinted Polymer. *International Journal of Molecular Sciences* [online], 7, pp 155–178. Available from: www.mdpi.org/ijms/.
- Yilmaz, E., Mosbach, K. & Haupt, K. (1999). Influence of functional and cross-linking monomers and the amount of template on the performance of molecularly imprinted polymers in binding assays. *Analytical Communications*, 36(5), pp 167–170.
- Yilmaz, H. & Basan, H. (2015). Preconcentration of indapamide from human urine using molecularly imprinted solid-phase extraction. *Separation science*, 38(17), pp 3090–3095.
- Yoshizako, K., Hosoya, K., Iwakoshi, Y., Kimata, K. & Tanaka, N. (1998). Porogen Imprinting Effects. *Analytical Chemistry*, 70(2), pp 386–389.
- Zaidi, S. A., Han, K. M., Hwang, D. G. & Cheong, W. J. (2010). Preparation of open tubular molecule imprinted polymer capillary columns with various templates by a generalized procedure and their chiral and non-chiral separation performance in CEC. *Electrophoresis*, 31(6), pp 1019–1028.
- Zayats, M., Brenner, A. J. & Searson, P. C. (2014). Protein imprinting in polyacrylamide-based gels. *Biomaterials*, 35(30), pp 8659–8668.

Chapitre 1 : Etude bibliographique

- Zhang, H., Ye, L. & Mosbach, K. (2006). Non-covalent molecular imprinting with emphasis on its application in separation and drug development y. *Journal of Molecular Recognition*, 19, pp 248–259.
- Zhu, Q. Z., Haupt, K., Knopp, D. & Niessner, R. (2002). Molecularly imprinted polymer for metsulfuron-methyl and its binding characteristics for sulfonylurea herbicides. *Analytica Chimica Acta*, 468(2), pp 217–227.
- Zhu, X., Yang, J., Su, Q., Cai, J. & Gao, Y. (2005). Selective solid-phase extraction using molecularly imprinted polymer for the analysis of polar organophosphorus pesticides in water and soil samples. *Journal of Chromatography A*, 1092, pp 161–169.



Chapitre 2 :

Matériel et méthodes



Chapitre 2 : Matériel et méthodes

Dans cette partie nous présenterons successivement les réactifs et appareillages au cours de notre étude puis les méthodes de travail qui ont été utilisées durant la thèse.

2.1. Matériels

2.1.1. Réactifs

a) Solvants

Les solvants utilisés sont de qualité HPLC, ils ont été utilisés pour synthétiser les MIPs et extraire les OPs sur MIPs, ils sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 2.1. Solvants utilisés et leur degré de pureté.

Utilisations	Solvants	Pureté (%)	Fournisseurs
Synthèse des MIPs	Toluène	99,9	Sigma-Aldrich
	Diméthyl sulfoxyde (DMSO)	99,5	Sigma-Aldrich
	Acétonitrile (ACN)	99,9	VWR Prolabo Chemicals
	N, N-diméthyl formamide (DMF)	99	Sigma-Aldrich
	Acide acétique glacial	99,8	Carlo Erba
Caractérisation des MIPs	Hexane	97	Sigma-Aldrich
	Ethanol	99,8	Sigma-Aldrich
	Dichlorométhane	99,9	Sigma-Aldrich
Extraction des OPs sur MISPE	Chloroforme	99,8	Sigma-Aldrich
	Méthanol	99,9	Sigma-Aldrich
	Acétate d'éthyle	99,7	Sigma-Aldrich

A ces différents solvants s'ajoute l'eau bi-distillée (Milli-Q).

b) Réactifs de synthèse des MIPs

Les réactifs utilisés pour synthétiser les MIPs ont été achetés chez Sigma-Aldrich, ils sont présentés dans le tableau 2.2 :

Tableau 2.2. Produits et réactifs utilisés, structures et degré de pureté.

Produits et réactifs	Pureté (%)	Structure chimique
Acide itaconique (IA)	≥99 %	
Acrylamide (ACR)	≥99 %	
N-N-méthylène bis (acrylamide) (MBAA)	99%	
Ethylène glycol diméthacrylate (EGDMA)	98%	
Divinylbenzène (DVB)	80%	
Triméthyl propane triacrylate (TRIM)	Technical grade	
2,2'-Azobis (2-Méthyl propionitrile) (AIBN)	≥98 %	
Phosmet	Analytique standard	

c) Produits et réactifs utilisés pour la fabrication du biocapteur à acétylcholinestérase

- Pour la réalisation des électrodes à acétylcholinestérase nous avons utilisé :
 - des plaques de chlorure de poly (vinyle) (PVC) (200*100mm, 0,5mm) provenant de chez SKK (Denzlingen, Germany)
 - Différentes pâtes à sérigraphier à base de :
 - Graphite (Electodag 423 SS), acheté chez Acheson (Plymouth, UK)

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

- Argent/Chlorure d'argent (Electrodag 418 SS), acheté chez Acheson (Plymouth, UK)
- Carbone modifié par le cobalt-phtalocyanine, provenant de chez Gwent Electronic Materials Ltd. (Gwent, UK).
- L'acétylcholinestérase (EC 3.1.1.7) de drosophile (*Drosophila melanogaster*) génétiquement modifiée (B394) a été mise au point par le groupe de Pr D. Fournier (PPBS, Toulouse).
- Le pré-polymère de polyvinylalcool photo-polymérisable (PVA-AWP) utilisé pour immobiliser l'enzyme à la surface d'électrode, provient de chez Toyo Gosei (Japon).
- Le chlorure d'acétylthiocholine (ATChCl) et l'iodure d'acétylthiocholine (ATChI), substrats de l'acétylcholinestérase, proviennent de chez Sigma-Aldrich Chemical Company.
- L'agent chromogène DTNB (acide 5, 5'-dithiobis (2-nitrobenzoïque) (réactif d'Ellman) provient de chez Sigma-Aldrich Chemical Company. Il a été utilisé pour calibrer la quantité d'enzyme immobilisée à la surface d'électrode.
- Le N-bromosuccinimide (NBS) (99%), utilisé pour oxyder le phosmet en phosmet oxon, provient de chez Sigma-Aldrich Chemical Company.
- Le tampon phosphate a été réalisé avec du phosphate de potassium monobasique (KH_2PO_4), phosphate de sodium dibasique (Na_2HPO_4) et chlorure de potassium (KCl), tous ces produits sont fournis par Sigma-Aldrich. Le tampon a été obtenu en mélangeant KH_2PO_4 à 0,1 M et Na_2HPO_4 à 0,1 M afin d'ajuster le pH à 7, il a ensuite été supplémenté en KCl 0,1 M.

2.1.2. Appareillages

a) Détection des organophosphorés

Les détections des OPs ont été réalisées par capteur à acétylcholinestérase (AChE) ou par HPLC.

a.1) Capteur à acétylcholinestérase

Le capteur à acétylcholinestérase est constitué d'une électrode, sur laquelle l'enzyme AChE est immobilisée, reliée à un potentiostat connecté à un enregistreur (figure 2.1).

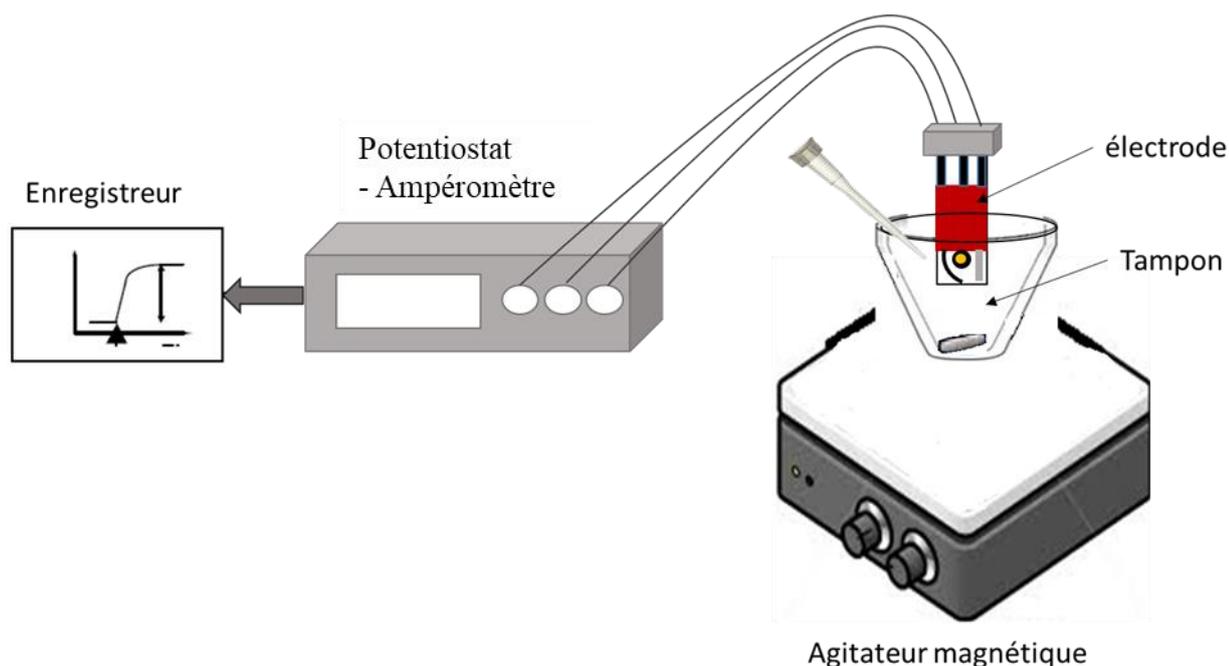


Figure 2.1. Représentation du montage utilisé pour les mesures ampérométriques.

- Les électrodes (systèmes à 3 électrodes) (figure 2.2) ont été fabriquées au sein du laboratoire BAE à l'aide d'une machine à sérigraphier semi-automatique « DEK 248 screen-printing system » (DEK, Weymouth, Royaume-Uni), qui permet d'imprimer à la surface d'une plaque de PVC souple les composants suivants :
 - Une électrode de référence à base de pâte d'Ag/AgCl sérigraphiée, de dimensions 5mm x 1,5mm, permettant d'imposer le potentiel d'oxydation de l'espèce mesurée.
 - Une électrode de travail à base de pâte de carbone, de diamètre 4 mm, qui peut incorporer un médiateur électrochimique comme le cobalt-phtalocyanine.
 - Une électrode auxiliaire incurvée à base de pâte de carbone, de dimensions 16 mm x 1,5 mm, qui assure le passage du courant.
 - Une couche isolante séparant les électrodes des contacteurs.

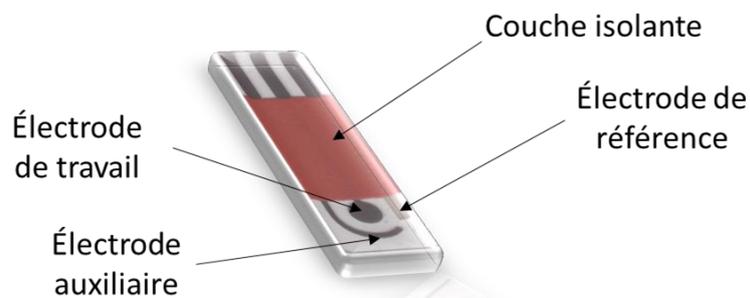


Figure 2.2. Système à trois électrodes sérigraphiées.

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

- Le potentiostat (ampéromètre), de type Metrohm 641 VA Detector (Metrohm, Suisse) permet d'imposer un potentiel constant entre l'électrode de travail et l'électrode de référence.
- L'enregistreur papier est un Flatbed Recorder de chez Kipp & Zonen (Hollande).
- L'agitation est réalisée avec les agitateurs orbitaux Bioblock Scientific Top-Mix 94500.

Les mesures de pH ont été effectuées sur un pH mètre Sension+ pH 31 (Hach).

a.2) HPLC

Un chromatographe HPLC de type Elite Lachrom (VWR-Hitachi) piloté par le logiciel EZ Chrom et couplé à un détecteur UV-visible à barrettes de diodes a été utilisé pour valider les différentes analyses quantitatives du phosmet et du diméthoate,

b) Synthèse et lavage des MIPs

La synthèse des MIPs par voie thermique a été effectuée dans un bain d'huile à température fixe en utilisant l'agitateur chauffant Heidolph MR Hei-Standard couplé à un thermomètre électronique. Les étapes de lavage des MIPs et NIPs ont été réalisées sur Soxhlet en utilisant une cartouche en cellulose Whatman TM de 25 mm x 90 mm (GE Healthcare Life Sciences) (figure 2.3). L'appareil utilisé pour chauffer le solvant dans le ballon est fourni par Electromantle. La filtration préalable des échantillons a été réalisée avec des filtres PTEF-45/25 0,2 µm (Ministar, Sartorius).

c) Extraction des organophosphorés par MISPE « Molecularly Imprinted Solid Phase Extraction »

L'extraction d'organophosphorés sur cartouche a été réalisée en remplissant des MIPs ou des NIPs, soit dans des colonnes en verre 3 mL (Chromabond) équipés de frittés en polyéthylène (Supelco), soit dans une colonne couplée à une chambre d'extraction (SPE Vacuum Manifolds, Phenomenex), elle-même reliée à une pompe à vide (Plastibrand® Water Jet Filter Pump) (configuration « normale »). En configuration « inverse », une colonne de verre Omnifit (ø 10 mm) a été utilisée et connectée à une pompe seringue Tecna multivoies (figure 2.3).

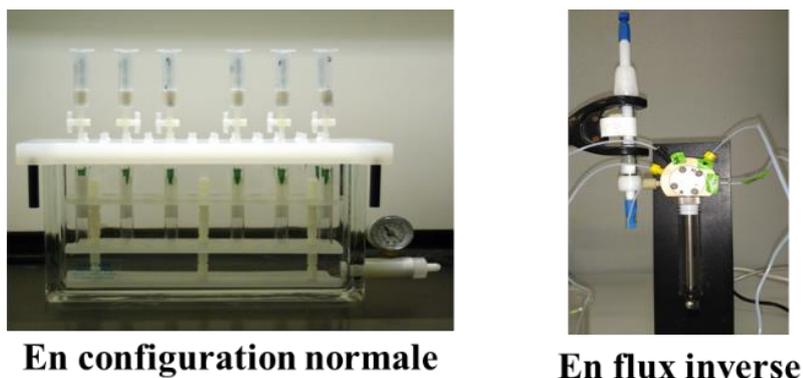


Figure 2.3. Extraction des organophosphorés par MISPE.

2.2. Méthodes

2.2.1. Méthodes de détection du phosmet

a) Détection par HPLC

La séparation chromatographie a été réalisée en utilisant la phase inverse par la colonne C18 Lama® (250 x 4,6mm, 5* μ m). La phase mobile utilisée est constituée d'un mélange acétonitrile /eau 0,1 % TFA (65%/35%, v/v), son débit est ajusté à 1 mL/min. Le volume d'injection est 20 μ L, les longueurs d'onde de détection du phosmet et du diméthoate sont respectivement de 228 nm et 220 nm.

Le tableau 2.3 présente les principales caractéristiques obtenues pour la quantification du phosmet et du diméthoate.

Tableau 2.3. Produits et réactifs utilisés, structures et degré de pureté.

	Phosmet	Dimethoate
Régression linéaire (y=surface du pic)	$y = 1,665 \times 10^{+11} (C_{\text{phosmet}(M)}) + 9,24 \times 10^{+4}$	$y = 1,8677 \times 10^{+10} (C_{\text{dimethoate}(M)}) + 2,8375 \times 10^{+3}$
Gamme d'étalonnage	$2 \times 10^{-7} \text{ M} - 2 \times 10^{-4} \text{ M}$	$5 \times 10^{-7} \text{ M} - 1 \times 10^{-4} \text{ M}$
Limite de détection	$5 \times 10^{-8} \text{ M}$	$1 \times 10^{-7} \text{ M}$
Coefficient distribution %	99,99	99,9

b) Détection par Biocapteur

La fabrication du biocapteur consiste en différentes étapes :

b.1) Dosage colorimétrique de l'activité enzymatique

En général, l'activité enzymatique des enzymes en solution est exprimée en unités internationales (UI), 1UI définissant la quantité d'enzyme qui catalyse la transformation d'une micromole de substrat par minute ($\mu\text{mol}/\text{min}$). L'activité de l'acétylcholinestérase a été déterminée par des mesures spectrophotométriques, basées sur la loi de Beer-Lambert :

$$A = \varepsilon \cdot C \cdot L$$

Où A = Absorbance du composé mesurée à une longueur d'onde fixe

ε = Coefficient d'extinction molaire ($\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

C = Concentration du composé détecté ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

L = Longueur du trajet optique dans la cuve (cm)

La vitesse initiale (V_i , UA / sec) de la réaction enzymatique a été déterminée en mesurant la pente de la partie linéaire de la cinétique ($A = f(\text{temps})$) (figure 2.4).

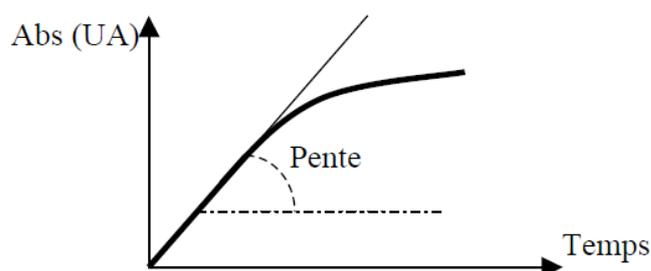


Figure 2.4. Représentation d'une cinétique enzymatique.

Dans notre cas, l'activité enzymatique de l'enzyme l'acétylcholinestérase a été déterminée par la méthode d'Ellman ((Ellman *et al.*, 1961) qui consiste à lui fournir un substrat synthétique : l'acétylthiocholine, dont l'hydrolyse libère de la thiocholine et de l'acide acétique (figure 2.5).

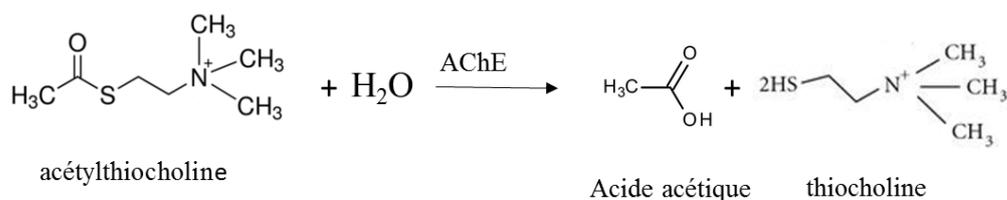


Figure 2.5. Réaction d'hydrolyse de l'acétylthiocholine en thiocholine et acide acétique.

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

La thiocholine réagit avec un agent chromogène, le DTNB (acide 5,5-dithiobis (2-nitrobenzoïque), pour donner un complexe de couleur jaune qui absorbe à $\lambda_{\text{max}}=412 \text{ nm}$ ($\epsilon=1,36 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (figure 2.6).

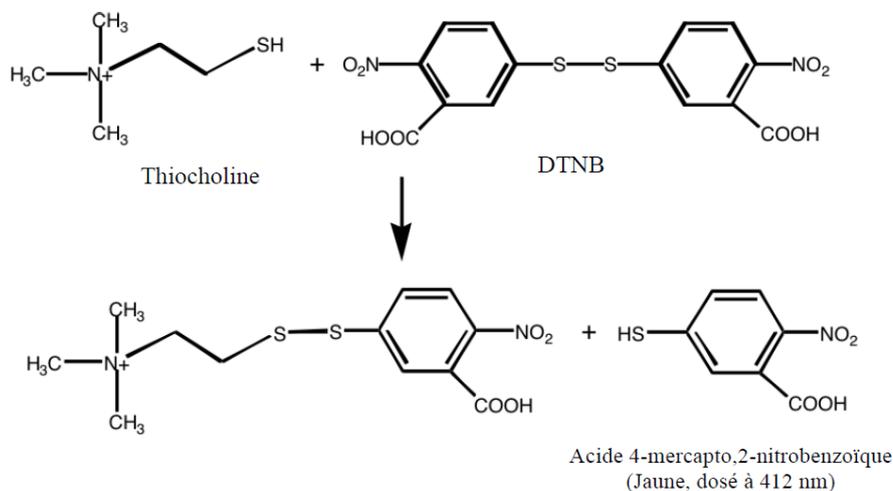


Figure 2.6. Détection colorimétrique de la thiocholine par la méthode d'Ellman (Ellman *et al.*, 1961).

Le protocole de mesure de l'activité enzymatique est présenté dans le tableau 2.4. La réaction démarre dès l'ajout du substrat dans la cuve de mesure. La cinétique de la réaction est ensuite suivie à 412 nm pendant 1 min. La pente mesurée dans la partie linéaire de la cinétique permet de calculer la vitesse initiale de la réaction. La vitesse maximale de la réaction est obtenue en conditions saturantes en substrat, elle permet de calculer l'activité enzymatique. Dans notre cas, elle a été déterminée en utilisant 1 mM de substrat acétylthiocholine.

Tableau 2.4. Protocole de mesure de l'activité enzymatique de l'acétylcholinestérase.

Réactifs (μL)	Blanc	Essai
Tampon phosphate 0,1M, pH=7	500	490
DTNB 1 mg/ml	300	300
Eau distillée	100	100
ATChI (substrat) 10 mM	100	100
AChE (enzyme)	-	10

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

Le calcul de la vitesse maximale de l'enzyme V_{\max} permet de calculer l'activité des solutions enzymatiques selon la loi de Beer-Lambert en utilisant la relation suivante :

$$\text{Activité (UI.mL}^{-1}\text{)} = \frac{V_{\max} \times 60}{13600 \times 10^6 \times 10^{-3} \times 10^2}$$

V_{\max} : Vitesse maximale en UA. sec⁻¹

60 : Facteur de conversion en UA. min⁻¹

13600 : Coefficient d'absorbance (ϵ) du DTNB à 412nm en L.mol⁻¹cm⁻¹

10⁶ : Facteur de conversion en $\mu\text{mol. L}^{-1}.\text{min}^{-1}$

10⁻³ : Facteur de conversion en $\mu\text{mol. min}^{-1}$ (UI) pour un volume réactionnel de 1 mL

10² : Facteur de conversion en UI. mL⁻¹ (pour un volume enzymatique 10 μL).

Cette relation permet de connaître la quantité d'enzyme immobilisée sur la surface de l'électrode (exprimée en activité catalytique). Dans notre cas, il a été calculé qu'une vitesse maximale mesurée (V_{\max}) égale à $2,5 \times 10^{-3}$ UA. sec⁻¹ correspond à une quantité d'enzyme immobilisée de 1 mUI / électrode.

b.2) Méthode d'immobilisation de l'acétylcholinestérase

Afin de permettre de conserver au maximum l'activité enzymatique et préserver la conformation tridimensionnelle de l'enzyme spécialement au niveau de son site d'actif, l'acétylcholinestérase a été immobilisée sur l'électrode de carbone (figure 2.7). Différentes techniques d'immobilisation peuvent être envisagées, il a été choisi ici de piéger l'acétylcholinestérase dans un gel photo polymérisable de polyvinylalcool (PVA-AWP), il s'agit d'une méthode d'immobilisation douce permettant de préserver l'activité des enzymes. Cette méthode étant couramment utilisée au laboratoire BAE, nous avons donc suivi un protocole précis pour réaliser cette immobilisation. Le nombre d'unités enzymatique déposées sur l'électrode a été calculé par une détection colorimétrique présentée dans le paragraphe b.1 précédent.

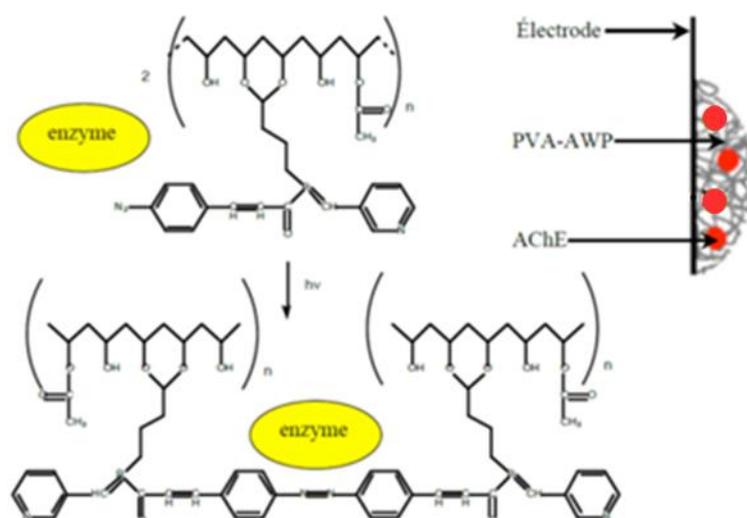


Figure 2.7. Principe de l'immobilisation par piégeage dans une matrice de PVA-AWP (d'après la thèse G. Istamboulié, 2009).

Le protocole d'immobilisation est le suivant :

La solution enzymatique est mélangée dans un rapport volumique de 30% :70% avec le polymère biocompatible et photo polymérisable PVA-AWP, puis 3 μL du mélange obtenu sont déposés à la micropipette à la surface de l'électrode de travail, correspondant à 1mUI d'AChE par électrode.

Les électrodes sont été ensuite placées sous lumière blanche à 4°C durant 24 heures pour que la photo-polymérisation se fasse. Les biocapteurs ainsi conçus sont ensuite conservés à 4°C durant au minimum une semaine pour séchage.

b.3) Détection ampérométrique des insecticides organophosphorés

Le suivi de l'activité enzymatique a été réalisé par des mesures ampérométriques dans une cellule de réaction contenant de 10 mL de tampon de phosphate à 0,1M, pH7 contenant 0,1M de KCl. L'électrode modifiée avec l'acétylcholinestérase est immergée dans le tampon, sous agitation magnétique constante, et un potentiel de +100 mV est appliqué par rapport à l'électrode de référence Ag/AgCl. Ce potentiel correspond au potentiel d'oxydation du médiateur cobalt-phtalocyanine (Co-PC) incorporé dans l'électrode du travail.

La réaction est initiée par l'ajout de substrat acétylthiocholine (ATCh-Cl) dans la cellule. Ce substrat est hydrolysé par l'enzyme en thiocholine et acide acétique. La thiocholine produite est alors oxydée par le médiateur cobalt-phtalocyanine (Co-Pc), qui est lui-même réoxydé à 100 mV vs Ag / AgCl, générant un courant dont l'intensité (I_0) est corrélée à l'activité de l'enzyme.

En présence d'organophosphorés, l'AChE est irréversiblement modifiée par phosphorylation d'une sérine présente dans son site actif estérasique. Les mesures d'inhibition sont donc réalisées suivant le même protocole mais après incubation de l'électrode dans une solution de pesticide de concentration connue pendant un temps fixe. La réponse finale I_f est mesurée en présence de la même concentration de substrat.

Le pourcentage d'inhibition est calculé suivant la formule :

$$I\% = \left[\frac{I_0 - I_f}{I_0} \right] \times 100$$

Les phosphorothionates caractérisés par un groupement thione (P=S) et trois groupes O-R liés à un atome de phosphore possèdent un potentiel phosphorylant de l'acétylcholinestérase bien moins important que leurs analogues oxydés (P=O). Afin d'augmenter la sensibilité de détection du phosmet, un agent d'oxydation, le N-bromosuccinimide (NBS), a été ajouté dans le milieu réactionnel à une concentration finale de 10^{-6} M. Cette concentration n'affecte pas l'activité de l'acétylcholinestérase mais elle est capable d'oxyder une concentration de phosmet allant jusqu'à 3×10^{-7} M (Schulze *et al.*, 2002 ; Schulze *et al.*, 2004 ; Kralj *et al.*, 2006 ; El-Moghazy *et al.*, 2016). Le taux d'inhibition dépend non seulement de la concentration en inhibiteur mais aussi du temps d'incubation. En effet, une augmentation de l'inhibition en prolongeant le temps d'inhibition est observée jusqu'à l'obtention d'un plateau où le taux d'inhibition ne varie plus. Ce plateau a été obtenu à 10 min pour les concentrations de phosmet testées, il a été utilisé dans la suite du travail.

2.2.2. Synthèse de MIPs

a) Choix des réactifs et conditions opératoires

a.1) Choix du monomère fonctionnel par modélisation informatique

La modélisation informatique a été réalisée par l'équipe du Professeur Piletsky à l'Université de Leicester (superordinateur ALICE). L'interaction phosmet/monomère fonctionnel a été simulée en utilisant le logiciel de modélisation SYBYL 7.3 (Tripos Inc. ST. Louis, MO, USA) en utilisant l'algorithme Leapfrog TM. Le modèle moléculaire de phosmet a été créé et chargé avec la méthode de calcul Gasteiger-Huckel avant la minimisation de l'énergie. La structure optimisée a été générée par minimisation de la charge de la molécule cible plus de 15 000 itérations à une valeur $0,001$ K cal. mol⁻¹. L'expérience a été réalisée en chauffant et refroidissant successivement

la molécule de phosmet afin d'assurer la liberté de toutes les liaisons et atteindre la structure la plus favorable énergiquement. La simulation a été réalisée sur une gamme de températures de 700 à 300 K pour 100000 itérations en chaque température. La structure du phosmet la plus probable obtenue est présentée dans la figure 2.8.

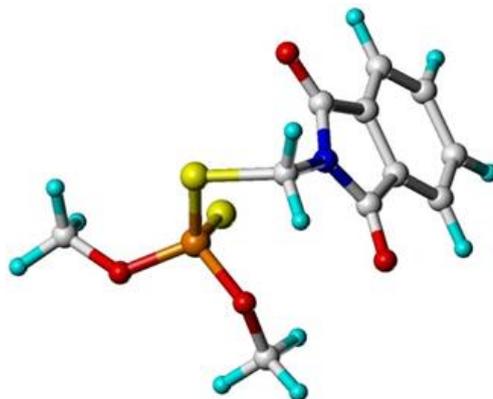


Figure 2.8. Structure modélisée du phosmet.

a.2) Préparation du complexe monomère fonctionnel- phosmet et évaluation par capteur à l'acétylcholine estérase

Trois solutions de phosmet à 0,032 M ont été préparées dans trois solvants différents : l'acétonitrile (ACN), le N,N,diméthylformamide (DMF) et le diméthylsulfoxyde (DMSO), ayant des indices de polarité respectifs de 5,8 ; 6,4 et 7,2. Des dilutions successives ont été réalisées afin d'obtenir des concentrations connues de phosmet dans chaque solvant. Une courbe de calibration de biocapteur a été réalisée pour chaque solution, pour des concentrations finales de phosmet dans la cellule comprises entre 2×10^{-10} M et 10^{-8} M.

Le complexe de pré-polymérisation phosmet /monomère fonctionnel (MF) a été préparé à deux ratio molaires 1:4 ou 1:8 en diluant 0,032 M de phosmet et 0,128 M ou 0,256 M de MF dans les trois solvants choisis précédemment. En parallèle, des solutions témoins ont été préparées contenant 0,032 M de phosmet seul ou 0,128 M de chaque MF. Après des temps d'incubation définis, les solutions ont été diluées afin d'obtenir une concentration finale dans la cellule de mesure de 10^{-8} M de phosmet et/ou 4×10^{-8} M de MF.

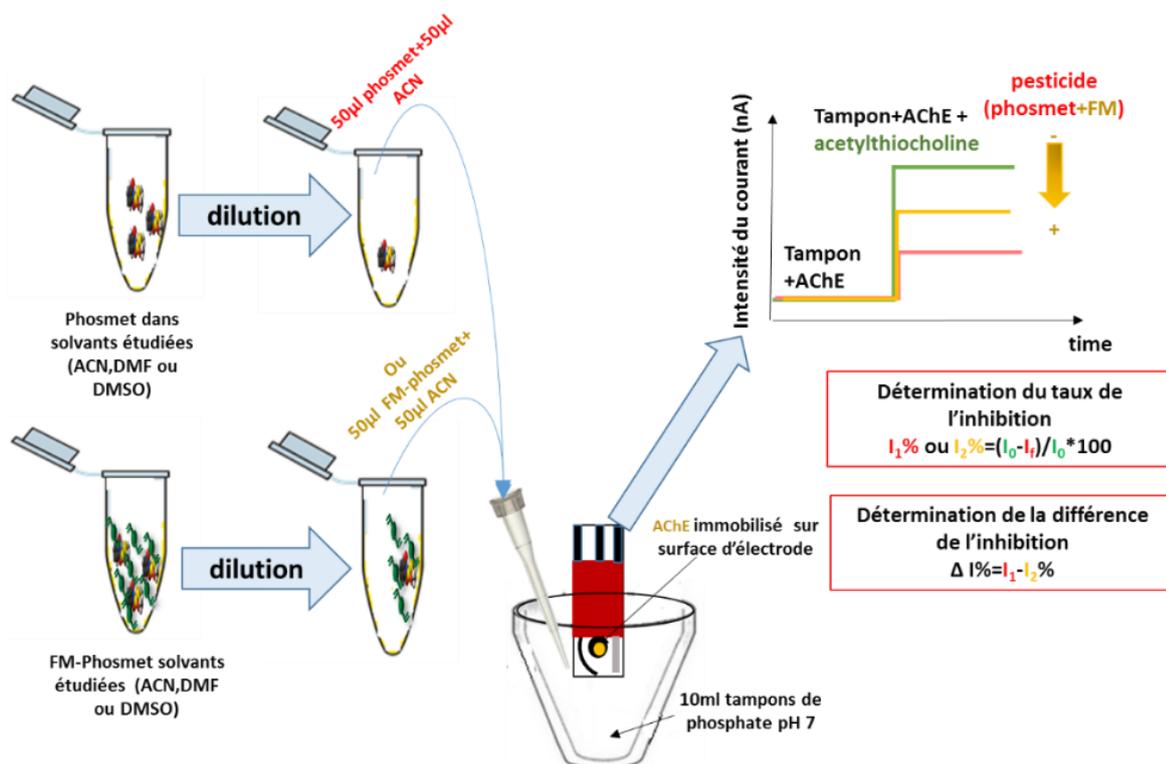


Figure 2.9. Schéma de détermination de l'effet du complexe phosmet-MF sur le capteur à AChE.

Les trois monomères fonctionnels testés ont été sélectionnés par modélisation informatique. Ils possèdent des énergies d'interaction les plus basses avec le phosmet. La figure 2.9 présente le protocole d'étude de l'effet du complexe phosmet-MF sur le biocapteur à AChE.

b) Mode opératoire

b.1) Synthèse de polymères par polymérisation en masse

On introduit dans un tube de Pyrex de 1,4 x 4,5 cm (5 mL de volume) :

- la molécule cible (phosmet) (0,16M).
- le monomère fonctionnel soit : MBAA, ACR ou MAA (ratio molaire 1:4 entre la molécule cible et le monomère fonctionnel).
- le solvant porogène : toluène ou DMSO (1 mL).

Après 15 min à 20°C, sont ajoutés :

- l'agent réticulant : EGDMA (ratio molaire 1:20 entre la molécule cible et l'agent réticulant)
- l'initiateur : AIBN (1,5 % de la masse du monomère fonctionnel + agent réticulant).

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

L'ensemble est dégazé par bullage d'azote pendant 10 min dans un bain d'eau glacée puis le tube est fermé sous gaz inerte (azote), le milieu réactionnel est ensuite chauffé dans un bain d'huile à 60°C pendant 19 h. Après polymérisation, les polymères sont alors broyés et tamisés afin d'obtenir des particules entre 45 et 100 µm puis lavés selon la procédure décrite en section (b-3).

b.2) Synthèse de polymères par polymérisation en précipitation

Dans une ampoule de Pyrex de 1,9 x 5 cm (10 mL de volume) sont introduits :

- la molécule cible (phosmet) ($3,2 \cdot 10^{-2}M$).
- le monomère fonctionnel MBAA (au ratio molaire 1:4 entre la molécule cible et le monomère fonctionnel).
- le solvant porogène : 5 mL DMSO

Après 1 h à 20°C, sont ajoutés :

- l'agent réticulant : EGDMA, ou DVB, ou TRIM (ratio molaire 1:26).
- l'initiateur : AIBN (1,5% de la masse du monomère fonctionnel+ l'agent réticulant).

Les ampoules sont ensuite fermées en utilisant des bouchons munis de septums. L'ensemble est dégazé par bullage d'azote pendant 10 min dans un bain d'eau glacée, et le milieu réactionnel est ensuite chauffé dans un bain d'huile à 60°C pendant 19 h. Après polymérisation, les polymères sont alors broyés et tamisés afin d'obtenir des particules de 45 à 100 µm puis lavés selon la procédure décrite en section (b-3).

b.3) Procédure de lavage

La procédure de lavage est identique pour tous les polymères synthétisés en utilisant une extraction au Soxhlet avec un mélange acétate d'éthyle/méthanol/acide acétique (4:4:2, v/v) durant 48 h, puis avec un mélange méthanol/acide acétique (8 :2, v/v). Pour finir, le polymère est séché à 60°C dans une étuve.

2.2.3. Caractérisation des MIPs

La caractérisation de MIPs consiste en l'étude de la sélectivité et de l'affinité du polymère pour la molécule cible.

a) Détermination des propriétés d'adsorption

Les propriétés d'adsorption des polymères à empreinte moléculaires dépendent de la nature et de la répartition des sites de reconnaissance, qui peuvent être distribués de manière homogène ou hétérogène (figure 2.10) (Ansell, 2015).

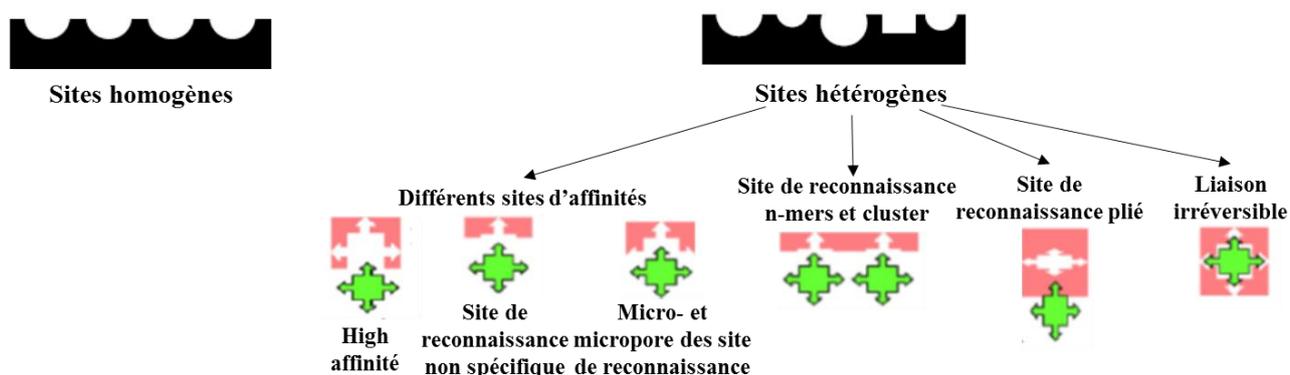


Figure 2.10. Représentation des sites de reconnaissance des MIPs (adapté de García-Calzón & Díaz-García, 2007 et Umpleby *et al.*, 2004).

Une distribution homogène se traduit par la présence de sites de reconnaissance identiques qui ont la même affinité et sélectivité. En revanche, un polymère hétérogène comportera des sites de reconnaissance variables, de formes et de profondeurs différentes, caractérisés par différentes affinités et sélectivités (figure 2.10) (Umpleby *et al.*, 2004).

Le concept de l'empreinte moléculaire suggère que les sites de reconnaissance sont distribués de manière homogène. Toutefois, les résultats expérimentaux ont démontré qu'une distribution hétérogène des sites de reconnaissance est communément obtenue pour les MIPs pour les raisons suivantes :

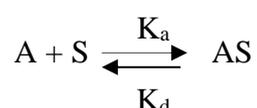
- 1- La copolymérisation du complexe molécule empreinte-monomère fonctionnel est un procédé au cours duquel les chaînes polymériques s'organisent de manière aléatoire autour de la molécule empreinte, avec des degrés de polymérisation divers. Il en résulte la formation de sites de reconnaissance divers possédant des affinités et des constantes d'association variables (García-Calzón & Díaz-García, 2007).

- 2- La dissociation du complexe molécule empreinte-monomère fonctionnel en solution, en particulier lorsque le monomère fonctionnel est utilisé en excès (principe de Le Chatelier). Dans ce cas, la plupart des monomères fonctionnels restent libres et orientés de manière aléatoire dans le mélange, ce qui conduit à différentes formes d'agrégats molécule empreinte-monomère fonctionnel, de constantes de formation variables. Il en résulte une polymérisation irrégulière générant des sites de fixation possédant des constantes d'association différentes.
- 3- La polymérisation aléatoire du complexe molécule empreinte-monomère fonctionnel adjacents peut conduire à la formation de sites « incomplets » de plus faible affinité pour la molécule cible.
- 4- Les sites de reconnaissance peuvent subir des modifications après extraction de la molécule empreinte par le solvant. Ces « effondrements » stabilisés par des liaisons entre groupements fonctionnels du co-polymère conduisent à des sites de fixation inactifs (García-Calzón & Díaz-García, 2007).

Trois propriétés d'intérêt particulier sont généralement étudiées lors de la caractérisation des sites de reconnaissance :

1- L'affinité des sites de reconnaissance :

La fixation (et la libération) de l'analyte (A) des sites de fixation (S) du polymère imprimé peut être représentée par l'équilibre suivant :



Où K_a est la constante d'association (en $\text{mol}^{-1} \text{L}$). Si on assume que tous les sites de fixation sont identiques, on peut exprimer K_a par la relation suivante :

$$K_a = \frac{n_{\text{liés}}}{n_{\text{libre}} \times A} = \frac{1}{K_d}$$

K_d : constante de dissociation (en mol L^{-1}).

$n_{\text{liés}}$: moles des sites de polymère (S) liés à l'analyte (= nombre de moles d'analyte lié).

n_{libres} : moles des sites de polymère (S) libres (en mol.).

Malheureusement, les sites de fixation n'étant pas tous équivalents, la grandeur K_a peut différer d'un site à l'autre. De même, il est très difficile de quantifier le nombre de sites

libres du polymère, ce qui complique le calcul des constantes d'association. De plus le nombre de sites libres dans le polymère n'est pas facile à déterminer.

Dans ces conditions, on préfère généralement calculer le rapport de distribution (D) (exprimé en $L.g^{-1}$), selon l'équation suivante :

$$D = \frac{B}{A} = \frac{n_{\text{liés}} \times V}{n_{\text{libre}} \times M}$$

B : « Concentration » d'analyte fixé (en $mol.g^{-1}$).

A : Concentration d'analyte (libre) en solution (en $mol.L^{-1}$).

M : Masse du polymère en (g).

V : Volume de la solution dans lequel les réactifs (polymère et analyte) sont incubés.

n_{libre} : La quantité d'analyte libre en solution. La quantité initiale est la somme de la quantité de la substance libre dans la solution et la quantité de la substance liée au polymère (Ansell, 2015) :

$$n_{\text{initiale}} = n_{\text{libre}} + n_{\text{liés}}$$

On peut donc définir la capacité d'adsorption du polymère ($mg.g^{-1}$) d'après l'équation suivante (Udomsap, 2014) :

$$Q = \frac{(C_{\text{initiale}} - C_{\text{libre}}) \times V}{M} \quad [7]$$

2- La sélectivité des sites de fixation

La présence de sites imprimés est généralement vérifiée en comparant un polymère imprimé avec un autre polymère synthétisé dans les mêmes conditions, mais en absence de la molécule empreinte. Ce polymère non imprimé est communément appelé NIP (« non-imprinted polymer »). Le paramètre habituellement calculé est le facteur d'impression (ou facteur d'empreinte) (IF), défini par le quotient des rapports de distribution obtenus sur MIP et sur NIP :

$$IF = \frac{D_{\text{MIP}}}{D_{\text{NIP}}} = \frac{B_{\text{MIP}}/A_{\text{MIP}}}{B_{\text{NIP}}/A_{\text{NI}}} = \frac{n_{\text{liés ; MIP}} / n_{\text{libre ; MIP}}}{n_{\text{liés ; NIP}} / n_{\text{libre ; NIP}}}$$

La valeur du facteur d'empreinte doit être supérieure à 1, ce qui signifie que le MIP fixe plus de molécule cible que le NIP. Toutefois, la signification de ce facteur d'empreinte est

sujette à controverse. En effet, un NIP peut fixer moins d'analyte car l'auto-association des monomères fonctionnels réduit le nombre de groupements fonctionnels libres au sein du polymère, et diminue par là-même ses capacités de rétention (non spécifique). Certains auteurs suggèrent qu'il est plus judicieux de comparer la rétention de la molécule cible sur son MIP avec celle obtenue sur un polymère imprimé avec une autre molécule empreinte (Ansell, 2015). De plus, un IF élevé ne garantit pas forcément la haute sélectivité des sites imprimés. Celle-ci peut être évaluée en comparant la fixation de la molécule cible avec celle d'une molécule de structure voisine, qualifiée de « compétiteur » :

$$\alpha_{\text{ concurrent}} = \frac{D_{\text{MIP (molécule cible)}}}{D_{\text{MIP (concurrent)}}$$

Le coefficient de sélectivité α ainsi obtenu doit être supérieur à 1, une valeur de α élevée constitue la preuve de la sélectivité des MIPs.

3- Les paramètres cinétiques de fixation

La fixation de l'analyte (A) sur le site imprimé (S) peut être représentée par l'équation suivante :



Où k_1 est la constante de vitesse ($\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$)

La vitesse de fixation peut être exprimée comme suit :

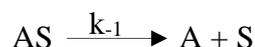
$$\frac{dn_{\text{liés}}}{dt} = k_1 \times n_{\text{libre}} \times A$$

Où A : Concentration d'analyte (libre) en solution ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$).

$n_{\text{liés}}$: Nombre de sites liés (ou nombre de mol. d'analyte fixé) (en mole).

n_{libres} : Nombre de sites libres (en mol.).

La dissociation de l'analyte (A) du site imprimé (S) peut être représentée par l'équation suivante :



Où k_{-1} est la constante de vitesse de dissociation (s^{-1}).

La vitesse de dissociation peut être exprimée comme suit :

$$\frac{dn_{\text{libre}}}{dt} = -\frac{dn_{\text{liés}}}{dt} = k_{-1} \times n_{\text{liés}}$$

Dans les conditions de l'équilibre thermodynamique on a donc :

$$k_{-1} \times n_{\text{liés}} = k_1 \times n_{\text{libres}} \times A$$

Soit :

$$\frac{n_{\text{liés}}}{n_{\text{libre}} \times A} = \frac{k_1}{k_{-1}} = K_a = \frac{1}{K_d}$$

Malgré le fait que les constantes k_1 et k_{-1} (et donc K_a et K_d) peuvent varier d'un site à l'autre, il est possible de mesurer dans des conditions déterminées les constantes apparentes k'_1 et k'_{-1} , qui sont régies par le transfert de masse de la phase liquide à la phase solide (polymère). Ce transfert peut être lent, compte tenu des contraintes de diffusion de l'analyte au travers du matériau solide, même si celui-ci est poreux. Les cinétiques sont souvent beaucoup plus rapides sur les polymères ou les films imprimés en surface que sur les matériaux monolithiques comportant des sites de fixation internes.

b) Isothermes d'adsorption et modèles

Une méthode efficace pour caractériser la fixation d'un analyte consiste à mesurer (ou calculer) la concentration d'analyte libre et lié pour une quantité donnée de polymère et une gamme de concentrations connues d'analyte. Le graphe représentant la concentration d'analyte lié en fonction de la concentration d'analyte libre est appelé isotherme de fixation (ou d'adsorption) (figure 2.11). On obtient généralement ce type d'isotherme en faisant varier la concentration d'analyte pour une masse de polymère et un volume réactionnel fixes. A l'équilibre, la concentration d'analyte libre est mesurée, ce qui permet d'en déduire la « concentration » d'analyte lié.

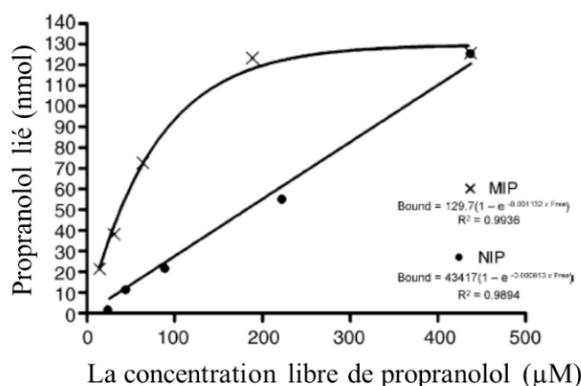


Figure 2.11. Exemple d'isothermes d'adsorption du propranolol obtenus sur MIP et NIP (d'après Castell et al., 2006).

Plusieurs modèles théoriques ont été décrits afin d'interpréter les isothermes d'adsorption et d'évaluer le nombre, le type et l'affinité du site de reconnaissance.

b.1) Modèle de Langmuir

Il s'agit d'un modèle de distribution discrète qui est basé sur trois hypothèses :

- L'adsorption ne peut se faire au-delà du niveau de la monocouche.
- Tous les sites de reconnaissances sont équivalents et ne peuvent adsorber plus d'une molécule cible.
- La capacité de la molécule cible à se fixer au site de reconnaissance est indépendante et n'affecte les sites voisins.

Selon ces hypothèses, l'adsorption est spécifique, le type des sites d'absorption est homogène, il suppose que chaque molécule cible occupe un site de reconnaissance. Au-delà d'une certaine concentration en molécule cible, l'isotherme d'adsorption atteint un plateau d'adsorption au niveau duquel les sites sont saturés. Cette valeur de concentration permet de calculer la capacité d'adsorption de surface.

$$Q = \frac{Q_{\max} K C_e}{1 + K C_e}$$

Q : Capacité d'adsorption de la molécule cible pour 1 gramme de polymère.

C_e : Concentration de la molécule cible libre en l'équilibre dans la solution (García-Calzón & Díaz-García, 2007).

Q_{\max} : Capacité de la saturation maximale du polymère monocouche.

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

La représentation de Langmuir ($1/Q$ en fonction de $1/C_e$) permet alors de déterminer la capacité maximale du polymère et la constante d'adsorption (Udomsap, 2014) :

$$\frac{1}{Q} = \frac{1}{Q_{\max}} + \frac{1}{K_L C_e} \frac{1}{Q_{\max}}$$

où K_L : Coefficient d'affinité d'adsorption.

Q_{\max} : Capacité d'adsorption maximale à l'équilibre.

Q : Capacité d'adsorption.

C_e : Concentration d'équilibre.

En pratique, les surfaces MIP se caractérisent par une répartition hétérogène des énergies de liaison. Les hypothèses du modèle de Langmuir sont alors loin d'être réalisées : la liaison de l'analyte au MIP peut impliquer la liaison multipoints et peut être affecté par une distribution locale non homogène des sites de liaison. En conséquence, une équation d'isotherme plus complexe doit être utilisée qui corresponde plus précisément aux données expérimentales. Dans ce cas, il est possible de considérer que la surface du polymère est constituée de m types de sites de fixation homogènes, chaque type présentant une constante d'adsorption différente ensembles de centres de liaison homogènes, chacun avec une constante d'adsorption différente (García-Calzón & Díaz-García, 2007). L'équation de Langmuir peut ainsi être réécrite comme suit :

$$Q = \sum_{i=1}^m \frac{Q_{i \max} K C_e}{1 + K C_e}$$

Où N_t est le nombre total de types de sites de liaison :

$$N_t = \sum_{i=1}^m N_i$$

b.2) Modèle de Freundlich

Plusieurs modèles empiriques ont été proposés afin de décrire l'hétérogénéité de la surface et la distribution dans les processus de sorption. Parmi eux, le modèle de distribution continue le plus courant est l'isotherme de Freundlich, initialement présenté comme un isotherme de sorption empirique adapté à des phénomènes de sorption non idéale sur des surfaces hétérogènes, et également à l'adsorption multicouches (García-Calzón & Díaz-García, 2007).

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

L'isotherme de Freundlich peut être décrite par l'équation suivante :

$$Q = a C_e^m$$

Après linéarisation, on obtient :

$$\log Q = \log a + m \log C_e$$

Où Q : Capacité d'adsorption.

C_e : Concentration d'équilibre.

m : Indice d'hétérogénéité, compris entre 0 et 1. Lorsque la valeur de m se rapproche de 0, l'hétérogénéité du matériau tend à augmenter, et lorsque la valeur de m égale à 1 tend vers un système homogène, ce qui rend l'équation de Langmuir applicable (Turriel *et al.*, 2003).

a : Coefficient d'adsorption de Freundlich ($\text{mg}^{(1-m)} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{L}^m$), il est dépend de la capacité maximale Q_{\max} ou du nombre totale de site d'adsorption N_t , elle peut dépendre aussi de la constante d'association moyenne K_{ass} (Umpleby *et al.*, 2004).

b.3) Analyse de la distribution d'affinité

Il s'agit ici d'utiliser une équation mathématique pour simplifier l'étude la distribution des sites de reconnaissance à la surface du polymère (MIP et NIP) (García-Calzón & Díaz-García, 2007).

Un modèle simplifiant l'équation de Freundlich a été développé par R. Sips (Sips, 1948), qui montre une décroissance exponentielle du nombre de sites d'adsorption N en fonction de la constante d'association K_{ass} , comprise dans une intervalle (K_{\min} - K_{\max}). Cet intervalle est lié aux concentrations en soluté choisies pour le tracé des isothermes d'adsorption.

$$K_{\min} = \frac{1}{C_{\max}} \quad \text{et} \quad K_{\max} = \frac{1}{C_{\min}}$$

Plusieurs équipes ont utilisé ce modèle dont l'équipe de G. Guiochon (Sajonz *et al.*, 1998) (Chen *et al.*, 2001), qui ont développé l'expression suivante à partir des paramètres a et m de Freundlich :

$$N_{(k)} = 2,303am (1-m^2) K^{-m}$$

Deux représentations peuvent être utilisées pour calculer l'affinité d'adsorption en utilisant l'isotherme de Freundlich (figure 2.12)

La représentation en semi-log (N_K vers $\log K_{\text{ass}}$) est décrite par l'équation suivante :

$$N_{(K)} = 2,303am (1-m^2) e^{-2,303m \log K}$$

Selon l'équation précédente et la figure 2.12, on observe que :

- La distribution d'affinité (N_k) décroît de façon exponentielle avec $\log K_{ass}$.
- N tend vers 0 pour les valeurs élevées de K_{ass} et tend vers l'infini pour des faibles valeurs de constante d'association ; ceci constitue une limite au modèle de Freundlich (Umpleby *et al.*, 2001). Ce modèle ne peut donc s'appliquer que pour des valeurs de K_{ass} assez grandes et pour des concentrations en analyte faibles.
- Pour un domaine donné, la surface comprise sous la courbe de distribution d'affinité est liée au nombre apparent de sites d'adsorption.

La seconde représentation (figure 2.12), linéarisée consiste à tracer $\log N$ en fonction de $\log K$, selon l'équation :

$$\log N_{(K)} = \log (2,303am (1-m^2)) - m K_{ass}$$

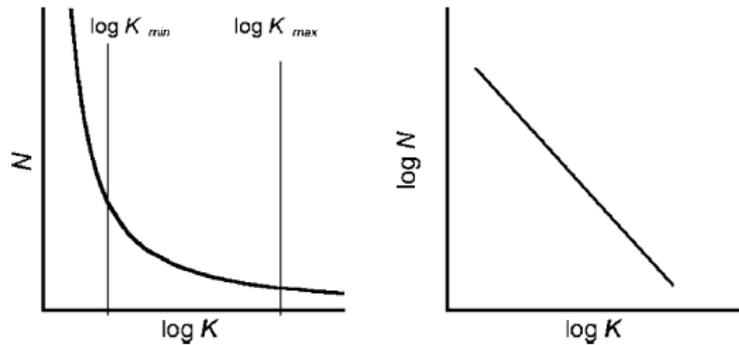


Figure 2.12. Représentations de la distribution d'affinité basée sur le modèle de Freundlich tracé en format semi-log (à gauche) et log (à droite) (Umpleby et al., 2004).

Le segment de droite obtenu à sa position verticale liée au nombre apparent de site d'adsorption. La pente du segment dépend de l'hétérogénéité du polymère (m). Cette représentation linéarisée permet donc de comparer facilement un MIP avec un NIP, ou deux MIPs entre eux, à partir de leurs distributions d'affinité, à condition d'utiliser les mêmes conditions de travail et la même gamme de valeurs de K_{ass} , soit le même domaine (F_{min} - F_{max}).

La fonction permettant d'estimer le nombre de sites d'adsorption N_{k1-k2} et \overline{K}_{K1-K2} la constante d'association dans l'intervalle $[K_1 ; K_2]$ situé dans le domaine $[K_{min} ; K_{max}]$ est la suivante (Umpleby *et al.*, 2004) :

$$N_{(K1-K2)} = a (1-m^2) (K_1^{-m} - K_2^{-m})$$

$$\overline{K}_{K1-K2} = \frac{m}{m-1} \left(\frac{K_1^{1-m} - K_2^{1-m}}{K_1^{-m} - K_2^{-m}} \right)$$

c) Méthodes expérimentales pour mesurer les isothermes d'adsorption

Plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour mesurer l'adsorption et la désorption de molécules sur les polymères de type MIPs ou NIPs :

c.1) Méthode par agitation (en suspension)

Cette méthode est la plus utilisée pour évaluer l'hétérogénéité des sites et de la capacité des MIP. Le polymère est agité avec une solution contenant une concentration connue de la molécule cible durant un temps spécifique. Une fois l'équilibre atteint, la concentration résiduelle de molécule cible dans le soluté est mesurée.

Avantages

- ✓ Très utile comme une première étape expérimentale pour évaluer la porosité et l'impression d'un polymère

Inconvénients

- Elle ne s'applique pas aux échantillons réels.
- L'expérience ne peut pas être réalisée si la réaction d'adsorption prend une grande durée.

La procédure utilisée dans cette thèse est la suivante :

La verrerie utilisée est constituée d'ampoules de verre de 50 mL très bien lavées, rincées à l'acétone et séchées à 70°C. 10 mg de polymère sont introduits puis 20 mL de solution de phosmet sont ajoutés (dans un mélange hexane/éthanol). Les ampoules sont fermées en utilisant des bouchons avec des septums. Le mélange est agité à l'aide d'agitateurs magnétiques à une vitesse 250 rpm, à température ambiante. Lorsque l'équilibre est atteint, les solutions sont laissées au repos durant 5 min. Le prélèvement du surnageant est effectué à l'aide d'une seringue en verre lavée dans les mêmes conditions que les ampoules. Après filtration sur filtre PTEF-45/25 de 0,2 µm, la concentration en phosmet est déterminée par HPLC-UV.

c.2) Méthode en flux (flow-through)

Les polymères sont utilisés comme phase stationnaire dans une colonne de chromatographie ou cartouche d'extraction, puis la solution de molécule cible de concentration connue est percolée. La concentration de molécule cible dans l'éluat est ensuite mesurée.

Avantage :

- ✓ L'étude de cinétique chimique et la libération de la molécule cible sont plus faciles à réaliser.
- ✓ La procédure peut être appliquée à des échantillons naturels.
- ✓ La procédure peut être réalisée dans le milieu saturé ou non saturé.

Inconvénients :

- La durée de l'expérience est longue, spécialement si la molécule cible est fortement retenue sur le polymère (Limousin *et al.*, 2007).
- La procédure ne permet pas de bien mélanger la molécule cible avec le polymère, des voies préférentielles peuvent être créées dans la matrice du polymère durant la percolation de la solution de dépôt (Jury & Flühler, 1992).

Dans cette thèse, des cartouches d'extraction en phase solide (SPE) en verre ont été utilisées comme support de la phase stationnaire constituée de MIP ou de NIP (50 mg déposés sur deux filtres en polyéthylène). Les cartouches sont reliés à une pompe à vide. Des solutions de phosmet (10^{-5} M ou 5×10^{-6} M préparés dans l'ACN) sont percolées sur les cartouches (Bakas *et al.*, 2013a), puis l'étape d'élution a été réalisée par 3 mL d'acétate d'éthyle. Tous les filtrats sont analysés par HPLC-UV.

2.2.4. Protocole d'extraction des organophosphorés (OPs) (phosmet) sur MISPE « *molecularly imprinted solid phase extraction* »

Ce protocole a été appliqué pour extraire spécifiquement de phosmet d'huile d'olive sur cartouches d'extraction en phase solide SPE. Pour ce faire, on a utilisé deux méthodes d'extraction, en configuration normale sur colonne classique ou en flux inverse sur colonne avec un flux ascendant automatisé (figure 2.13).

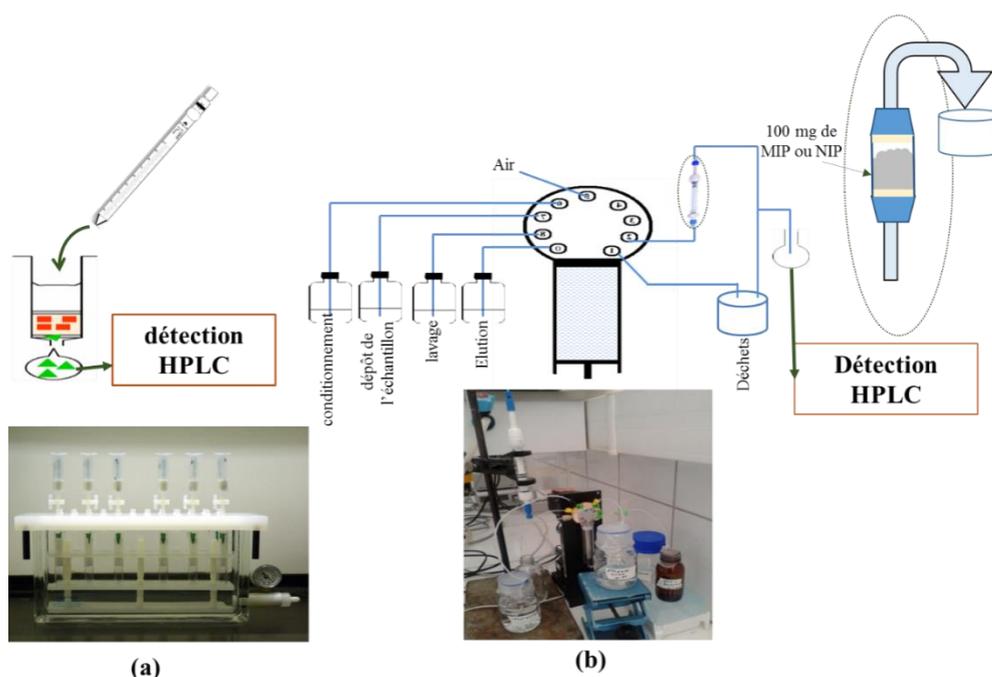


Figure 2.13. (a) Méthode d'extraction en configuration normale sur colonne classique, (b) Méthode d'extraction en flux inverse sur colonne avec un flux ascendant automatisé.

Pour les deux méthodes d'extraction, les quatre étapes suivantes sont nécessaires :

- Conditionnement : il permet d'activer les sites de reconnaissance et d'assurer des interactions reproductibles avec l'analyte.
- Dépôt de l'échantillon.
- Lavage de l'échantillon : cela permet d'éliminer les interférents et garder (piéger) la molécule cible.
- Elution : permet de collecter l'analyte.

a) En configuration normale sur colonne classique

L'extraction sur colonne classique a été réalisée en utilisant des cartouches SPE (verre) équipées de filtres en polyéthylène et reliées à une pompe à vide. 100 mg de MIP /ou NIP ont été mis en suspension dans de l'éthanol puis introduits dans les cartouches. Enfin, un second filtre a été déposé à la surface des particules du polymère.

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

Les étapes d'extraction sont les suivantes :

- Conditionnement : 6 mL acétate d'éthyle, 6 mL éthanol, 6 mL hexane.
- Dépôt de l'échantillon dilué soit dans 1mL l'hexane de 10^{-6} M ou soit dans 10mL de hexane/éthanol à (90 / 10) de 10^{-7} M.
- Lavage de l'échantillon : 3 mL hexane / éthanol soit (50 : 50) pour dépôt hexane ou soit (90 : 10) pour dépôt hexane/éthanol.
- Elution : 3 mL acétate d'éthyle.

b) En flux inverse sur colonne avec un flux ascendant automatisé

L'extraction à flux ascendant a été réalisée sur colonne de 600 PSI MAX (Benchmark TM columns, Royaume-Uni) contenant 100 mg de MIPs ou de NIPs. Le débit a été assuré par une pompe seringue multivoies (TECAN) de capacité 10 mL pilotée via un programme conçu sur le logiciel HYPERTERMINAL.

Ce système automatisé permet de percoler le solvant du bas vers le haut afin d'éviter la création des passages préférentiels dans la phase stationnaire (Jury & Flühler, 1992 ; Limousin *et al.*, 2007).

Les étapes d'extraction sont :

- Conditionnement : 6 mL acétate d'éthyle, 6mL éthanol, 6 mL hexane.
- Dépôt de l'échantillon dilué dans l'hexane : soit un volume de 3 mL d'hexane.
- Lavage de l'échantillon : 3mL hexane/éthanol (90 / 10).
- Elution : 3 mL acétate d'éthyle.

Chaque étape d'extraction a été précédée par une étape de rinçage de la seringue avec le solvant suivant.

❖ Préparation l'échantillon d'huile d'olive contaminant 3 ppm de phosmet

Protocole

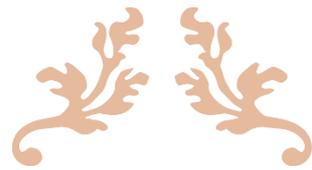
- Pesée de 10 g d'huile d'olive bio certifiée sans pesticide.
- Dopage avec 100 μ L de phosmet préparé dans l'hexane à 300 mg/L afin d'obtenir une concentration finale de phosmet à 3 ppm ($\approx 10^{-5}$ M).
- Agitation pendant 30 min à 45° C.
- 1 g de ce mélange est dilué dans 10 mL de solvant de dépôt et utilisé pour la percolation (soit $\approx 10^{-6}$ M de phosmet).

Références chapitre 2 : Matériel et méthodes

- Ansell, R. J. (2015). Characterization of the Binding Properties of Molecularly Imprinted Polymers. pp 51–93.
- Bakas, I., Oujji, N. Ben, Moczko, E., Istamboulie, G., Piletsky, S., Piletska, E., Ait-Addi, E., Ait-Ichou, I., Noguer, T. & Rouillon, R. (2013). Computational and experimental investigation of molecularly imprinted polymers for selective extraction of dimethoate and its metabolite omethoate from olive oil. *Journal of Chromatography A*, 1274, pp 13–18 Elsevier B.V.
- Castell, O. K., Allender, C. J. & Barrow, D. A. (2006). Novel biphasic separations utilising highly selective molecularly imprinted polymers as biorecognition solvent extraction agents. *Biosensors and Bioelectronics*, 22(4), pp 526–533.
- Chen, Y., Kele, M., Quiñones, I., Sellergren, B. & Guiochon, G. (2001). Influence of the pH on the behavior of an imprinted polymeric stationary phase — supporting evidence for a binding site model. *Journal of Chromatography A*, 927, pp 1–17.
- El-Moghazy, A. Y., Soliman, E. A., Ibrahim, H. Z., Noguer, T., Marty, J.-L. & Istamboulie, G. (2016). Ultra-sensitive biosensor based on genetically engineered acetylcholinesterase immobilized in poly(vinyl alcohol)/Fe–Ni alloy nanocomposite for phosmet detection in olive oil. *Food Chemistry*, 203, pp 73–78 Elsevier Ltd.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V. J. & Featherstone, R. M. (1961). A New and Rapid Colorimetric of Acetylcholinesterase Determination of Acetylcholinesterase Activity. *Biochemical Pharmacology*, 7, pp 88–95.
- García-Calzón, J. A. & Díaz-García, M. E. (2007). Characterization of binding sites in molecularly imprinted polymers. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 123, pp 1180–1194..
- Jury, W. A. & Flühler, H. (1992). Transport of Chemicals Through Soil: Mechanisms, Models, and Field Applications. *Advances in Agronomy*. pp 141–201.
- Kralj, M. B., Trebše, P. & Franko, M. (2006). Oxidation as a pre-step in determination of organophosphorus compounds by the AChE-TLS bioassay. *Acta Chimica Slovenica*, 53(1), pp 43–51.
- Limousin, G., Gaudet, J.-P., Charlet, L., Szenknect, S., Barthès, V. & Krimissa, M. (2007). Sorption isotherms: A review on physical bases, modeling and measurement. *Applied Geochemistry*, 22(2), pp 249–275.
- Sajonz, P., Kele, M., Zhong, G., Sellergren, B. & Guiochon, G. (1998). Study of the thermodynamics and mass transfer kinetics of two enantiomers on a polymeric imprinted stationary phase. *Journal of Chromatography A*, 810(1–2), pp 1–17.
- Schulze, H., Schmid, R. D. & Bachmann, T. T. (2002). Rapid detection of neurotoxic insecticides in food using disposable acetylcholinesterase-biosensors and simple solvent extraction. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 372(2), pp 268–72.
- Schulze, H., Schmid, R. D. & Bachmann, T. T. (2004). Activation of Phosphorothionate Pesticides Based on a Cytochrome P450 BM-3 (CYP102 A1) Mutant for Expanded Neurotoxin Detection in Food Using Acetylcholinesterase Biosensors. *Analytical Chemistry*, 76(6), pp 1720–1725.
- Sips, R. (1948). On the Structure of a Catalyst Surface. *The Journal of Chemical Physics*, 16(5), pp 490–495.

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

- Turiel, E., Perez-Conde, C. & Martin-Esteban, A. (2003). Assessment of the cross-reactivity and binding sites characterisation of a propazine-imprinted polymer using the Langmuir-Freundlich isotherm. *The Analyst*, 128(2), pp 137–141.
- Udomsap, D. (2014). Développement de polymères à empreintes moléculaires électrochimiques pour la surveillance en micropolluants organiques des eaux dans les ouvrages du Canal de Provence. Diss. Université de Toulon.
- Umpleby, R., Baxter, S. C., Rampey, A. M., Rushton, G. T., Chen, Y. & Shimizu, K. D. (2004). Characterization of the heterogeneous binding site affinity distributions in molecularly imprinted polymers. *Journal of Chromatography B*, 804(1), pp 141–149.
- Umpleby, R. J., Baxter, S. C., Bode, M., Berch, J. K., Shah, R. N. & Shimizu, K. D. (2001). Application of the Freundlich adsorption isotherm in the characterization of molecularly imprinted polymers. *Analytica Chimica Acta*, 435(1), pp 35–42.



Chapitre 3 :

Résultats et discussion



Chapitre 3 : Résultats et discussion

Chapitre 3 : Résultats et discussion

Les résultats présentés dans ce chapitre sont répartis en trois parties. Dans la première sera décrite l'étude des réactifs et des conditions optimales de polymérisation. Une deuxième partie présentera le choix des conditions optimales pour l'extraction du phosmet en milieu hydrophobe. Enfin la dernière partie de ce chapitre sera consacrée à l'extraction du phosmet de l'huile d'olive en utilisant les MIPs optimisés.

3.1. Sélection des réactifs adaptés aux synthèses des MIPs

Le but de cette étude a été de déterminer les réactifs de synthèse de MIPs et NIPs, à savoir le monomère fonctionnel, le solvant porogène, l'agent réticulant et l'initiateur, les plus adaptés pour le phosmet.

Dans un premier temps, nous ferons un point bibliographique sur les stratégies de synthèse de MIPs basés sur une approche non-covalente. Comme on peut le voir dans le tableau 3.1 la majorité des MIP utilisés en SPE (Solid Phase Extraction) ou MSPE (Micro Solid Phase Extraction) ont été synthétisés à partir d'acide méthacrylique (MAA) car il a la faculté au travers de ses groupements C=O ou C-OH de pouvoir établir des liaisons hydrogène avec des molécules cibles portant des groupements fonctionnels acides ou basiques (Pichon & Chapuis-Hugon, 2008). On peut aussi noter que la modélisation informatique a été utilisée dans de nombreux travaux pour sélectionner le monomère fonctionnel qui a l'énergie de liaison la plus forte avec la molécule cible (Piletsky *et al.*, 1999 ; Piletsky *et al.*, 2001 ; Karim *et al.*, 2017). Il apparaît aussi que l'éthylène glycol diméthacrylate (EGDMA) et le 2,2' Azobis(2-méthylpropionitrile) (AIBN) sont l'agent réticulant et l'initiateur les plus utilisés dans la synthèse de MIPs pour des molécules cible très variées.

On remarque que les solvants porogènes les plus utilisés sont les solvants qui sont peu à modérément polaires et aprotiques, comme le toluène, le dichlorométhane, le chloroforme et l'acétonitrile. Ces solvants organiques peuvent fortifier les interactions polaires comme les liaisons hydrogènes ainsi que les interactions électrostatiques entre la molécule cible (basique ou acide) et le monomère fonctionnel (Pichon & Chapuis-Hugon, 2008).

Chapitre 3 : Résultats et discussion

Tableau 3.1. Synthèse bibliographique des MIPs développés pour l'extraction en phase solide de composés à partir de matrices réelles, couplée hors ligne ou en ligne avec des méthodes analytiques (principalement chromatographie liquide).

Molécule Empreinte	Molécule cible (M.C.)	Matrice	Réactifs * M.F./A.R./S.P.	Ratio molaire (M.C/ M.F/ A.R.)	Type d'-extraction	Etapes d'extractions				Référence
						Conditionnement	Dépôt	Lavage	Elution	
Acide Pinacolyl Methyl Phosphonic (PMPA)	Acide Ethyle Methyl Phosphonic (EMPA)	Sol	MAA/ TRIM/ ACN	1:4:40	MISPE	10 mL ACN	5 mL ACN	5 mL ACN/ MeOH (98:2), 5 mL ACN/ MeOH (9:5)	5 mL Eau	(Le Moullec <i>et al.</i> , 2006)
Carbaryl	Carbaryl	Eau	MAA/ EGDMA/ ACN	1:4:20	MMI-SPE		10 mL Eau pH 3		400 µL MeOH,	(Bazrafshan <i>et al.</i> , 2017)
Chlorpyrifos	Chlorpyrifos	Jus de fruit	MAA/ EGDMA/ TOL	1:6:25	MISPE	2 mL H ₂ O, 2 mL Eth, 2 mL (MeOH/ Eau) (50:50)	2 mL échantillon	2 mL MeOH/ H ₂ O (60:40)	2 mL Eth	(Feng <i>et al.</i> , 2017)
Chlorpyrifos	Chlorpyrifos	Eau	MAA/ EGDMA/ ACN	1:4:20	MISPE	3 mL MeOH, 3 mL Eau	30 mL Eau	5 mL MeOH/ Eau (50:50)	5 mL MeOH/ AA (90:10)	(Binsalom <i>et al.</i> , 2016)
Dichlorvos	Dichlorvos	Légumes	MAA/ TRIM/ (ACN/TOL) (3/1)	1:2:10	MISPE	5 mL MeOH, 5 mL Eau	50 mL Eau		1,5 mL MeOH/ Eau (95:5)	(Xu <i>et al.</i> , 2010)
Fenitrothion	Fenitrothion	Tomate	MAA/ EGDMA/ DCE	1:4:20	MISPE	10 mL eau/AA (90:10), 10 mL ACN, 10 mL Hex	1 mL tampon pH7 /ACN (60:40) (v/v)	1 mL tampon pH7 /ACN (60:40), 1 mL TOL	3 mL DCE/ AA (90:10)	(Pereira & Rath, 2009)
Fenuron	Fenuron	Plants	MAA/ EGDMA/ TOL	1:4:20	MISPE	5 mL TOL	1 mL TOL	5 mL TOL	3 mL ACN/ AA (90:10)	(Tamayo <i>et al.</i> , 2003)
Indapamide	Indapamide	Urine	TFMAA/ EGDMA/ ACN	1:10:36	MISPE	2 x 0,5 mL ACN ou	4 x 0, 5 mL ACN	4 x 0,5 mL ACN	8 x 0, 5 mL MeOH	(Yilmaz & Basan, 2015b)
Iprodione	Iprodione	Urine	MAM/EGDMA /TOL	1:3,1:5,3	MISPE	5 mL MeOH, 5mL (Eau/Eth) (90:10)	6 mL échantillon	5 mL Eau/ Eth (90:10)	2 mL ACN	(Bitar <i>et al.</i> , 2014, 2015a et 2015b)
Fenuron	Isoproturon	Sol	MAA/ EGDMA/ TOL	1:4:20	MISPE		20 mL Acétone	5 mL TOL	3 mL ACN acidifié 10% AA	(Martín-Esteban <i>et al.</i> , 2001)
Monosulfuron	Monosulfuron	Sol	MAA/ EGDMA/ DMF	1:5:25	MISPE	10 mL ACN	0,5 mL ACN	3 mL Eau acidifié 0,2M NaOAC pH 3 /MeOH (70 :0)	5 mL MeOH acidifié 0,5% TFA	(Dong <i>et al.</i> , 2004)
S-Naproxen	Naproxen	Urine ou Eau	4-VP/ EGDMA/ TOL	1:4:20	MISPE	6 mL ACN/H ₂ O/AA (60/30/10),	10 mL échantillon acidifié AA pH 3	2 mL ACN	3 mL ACN acidifié 1% AA	(Caro <i>et al.</i> , 2004)
Diphenyl phosphate	Ions phosphates	Eau	1-allyl-2-thiourea/ EGDMA/ ACN	1:10:10	MISPE		1 L à 20 L tampon de phosphate 7,5)		50 mL MeOH	(Kugimiya & Takei, 2006, 2008)
Ditolyl phosphate	Diphenyl phosphate	Sang, urine	MAA/ EGDMA/ CHL	0,1g/ 0,37g/ 4,3 g	MISPE	3 mL CHL, 3 mL MeOH	1 mL MeOH	2 x 1 mL MeOH, 2 x 1 mL MeOH/ TFA (99:1)	3 x 1 mL MeOH/ TFA (94 :6)	(Moller <i>et al.</i> , 2001)

Chapitre 3 : Résultats et discussion

Metsulfuron-methyl (MSM)	Sulfonylurea	Sol, Riz, Soja, Maïs	MAA/ TRIM/ (ACN/TOL) (1/4)	1:4:4	DSPE	1 g sol + 20 mL ACN	2mL CHL, 1mL MeOH/ AA (9:1)	1mL ACN		(Peng <i>et al.</i> , 2010)
Hyoscyamine	Scopolamine	Sérum ou Urine	MAA/ EGDMA/ TOL	1:8:34	MISPE		1 à 10 mL échantillon acidifié pH5	1 mL ACN acidifié pH6	2 mL ACN/ AA (9:1)	(Theodoridis <i>et al.</i> , 2003)
Propazine	Triazine	Eau	MAA/ DVB/ (TOL/ACN) (25/75)	1:4:20	MSPE	4,5 mL TOL	Eau 20% NaCl	4,5mL (TOL/ ACN) (95:5)	0,45mL MeOH/ AA (95:5)	(Turiel <i>et al.</i> , 2016)
Tamoxifen	Tamoxifen	Urine	(MAA/St)/ EGDMA/ ACN	1:4:40	MISPE	4mL MeOH, 4 mL ACN, 4 mL tampon 20mM (AA/ NH ₂ OH) pH7	8 mL échantillon hydrolysée	6 mL tampon 20 mM (AA/ NH ₂ OH) pH7 / MeOH (95:5), 4 mL ACN	4 mL MeOH/ AA (99:1)	(Claude <i>et al.</i> , 2008)
Terbutylazine	Chlorotriazine	Eau	MAA/ EGDMA/ TOL	1:4:20	MISPE	1 mL MeOH, 1 mL Eau	0,5 mL Eau	1 mL CHL	3 mL MeOH	(Ferrer <i>et al.</i> , 2000)
Terbutylazine	Triazine	Eau	MAA/ EDMA/ CHL		MISPE	1mL MeOH, 1mL Eau	50 mL Eau	1 mL 0,1M HCl, 1 mL Eau, 5 mL CH ₂ Cl ₂	3mL MeOH	(Chapuis <i>et al.</i> , 2003)
Terbutylazine	Triazine	Eau	MAA/ EDMA/ CHL	1:4:20	MISPE	10mL CH ₂ Cl ₂	10 ou 25 mL Eau	10 mL CHL	3mL MeOH	(Chapuis <i>et al.</i> , 2004)
Terbutylazine	Triazine	Sole, Riz, Pomme, Lettice	MAA/ TRIM/ TOL	1:0,4:4	SBSE		5mL TOL, 500 rpm (60min)		Séché, ajouté 150 µL MeOH ((Hu <i>et al.</i> , 2010)
Telmisartan	Telmisartan	Urine	DMAEMA/ EGDMA/ CHL	1:3:20	MISPE	2 x 0,5 mL ACN	4 x 0,5 mL ACN	6 x 0,5 mL ACN	8x 0,5 mL (MeOH/AA) (9:1)	(Yilmaz & Basan, 2015a)
Thiabendazole	Thiabendazole	Agrumes	MAA/ EGDMA/ (TOL/ACN) (25:75), NP (Fe ₃ O ₄)	1:4:20	MMI-SPE	2 x 1 mL MeOH, 2 x 1 mL ACN (5min)	1 mL ACN (30 min)	2 x 1 mL ACN (5 min)	1 mL MeOH	(García-Fernández <i>et al.</i> , 2017)
2, 4, 6-Trichlorophenol	2, 4, 6-Trichlorophenol	Eau	MAA/ DVB/ (TOL/ACN) (1 :3)	1:8:40	MMI-SPE	Eau, ACN (2 min)	60 mL échantillon, agité avec MIMSPE (50 min)		2 mL ACN/ AA (99,7:0,3)	(Feng <i>et al.</i> , 2009)

DSPE : dispersive solide phase extraction ; MMI-SPE : magnetic molecularly imprinted solid-phase extraction; MSPE: micro solid-phase extraction ; SBSE : stir bar sorptive extraction ; MISPE : molecularly imprinted solid phase extraction ; DCE : dichlorométhane ; CHL : chloroforme ; MeOH : méthanol ; ACN : acétonitrile ; TOL : toluène ; AA : acide acétique ; Hex : hexane ; Eth : éthanol ; TFMAA: acide 2(trifluoro méthyl)acrylique; DMAEMA : 2-diméthylamino éthyle méthacrylate ; MAM: méthacrylamide ; TFA : acide trifluoroacétique ; NaOAC : acétate de sodium ; St : styrène.

* Dans toutes ces études l'AIBN a été utilisé comme initiateur.

Chapitre 3 : Résultats et discussion

3.1.1. Approche conventionnelle

Dans un premier temps, nous avons commencé par sélectionner des réactifs de synthèse des MIPs pour le phosmet en se basant sur la bibliographie, le choix le plus important pour la sélectivité des MIPs étant la sélection des monomères fonctionnels car ils sont responsables des interactions au sein des cavités présentes dans le polymère. La modélisation moléculaire informatique a été utilisée dans un premier temps car c'est une méthode rapide d'évaluation des interactions intermoléculaires (Turner *et al.*, 2004).

a) Pré-sélection de monomères fonctionnels par modélisation moléculaire informatique

La modélisation moléculaire a été réalisée par un programme informatique (algorithme de Leapfrog) à partir d'une base de données de 28 monomères fonctionnels (MF), elle a permis d'analyser toutes les interactions moléculaires possibles entre ces monomères fonctionnels et le phosmet. Ce programme « Leapfrog » calcule les diversités de contributions stériques et les énergies de liaison : liaisons ioniques, hydrogènes et interactions dipôle-dipôle. La méthode utilisée est basée sur 60000 itérations et les résultats sont interprétés en termes d'énergies empiriques contraignantes. La liste de classement des monomères fonctionnels ainsi que leurs énergies de liaison respectives pour le phosmet sont présentés dans le tableau 2.3.

Tableau 3.2. Energies de liaison entre le phosmet (molécule cible) et les différents monomères fonctionnels.

Monomère fonctionnel (MF)	Energie de liaison, kcal/mol
N, N'-Méthylènebisacrylamide (MBAA)	-27,68
Acrylamide (ACR)	-26,62
Acide itaconique (IA)	-18,22
Ethylène glycol méthacrylate phosphate (EGMP)	-17,78
Acide méthacrylique (MAA)	-15,33
Acide 2-(Trifluorométhyl) acrylique (TFMAA)	-15,06
Hydroxyéthyl méthacrylate (HEM)	-13,43
Déthylaminoéthyl méthacrylate (DEAEM)	-7,39
Ethylène glycol diméthylacrylate (EGDMA)	-5,90
1,3-Divinylbenzène (DVB)	-5,83
4-Vinylpyridine (4-VP)	-5,29
1,4-Divinylbenzène (pDVB)	-5,20

Ce tableau présente la sélection des monomères les plus appropriés qui sont capables de former les complexes moléculaires les plus forts avec le phosmet.

Chapitre 3 : Résultats et discussion

Les résultats obtenus montrent que les interactions varient fortement en fonction des monomères fonctionnels. Les monomères MBAA et ACR ont été identifiés comme les plus prometteurs, avec des énergies d'interaction respectives de $-27,7 \text{ kcal.mol}^{-1}$ et $-26,6 \text{ kcal.mol}^{-1}$.

b) Synthèse des polymères en masse

Nos expériences ont porté sur des synthèses d'un MIP capable d'extraire le phosmet d'un milieu hydrophobe, visant ainsi une application potentielle dans l'huile d'olive. Pour cela, nous avons choisi une stratégie de synthèse reposant sur l'approche non covalente tout en procédant par polymérisation en masse, cette stratégie étant la plus facile à mettre en œuvre.

En premier lieu, les choix des réactifs sont les suivants :

- Le choix du monomère fonctionnel est d'une grande importance par rapport à la sélectivité résultante du MIP. Pour cela des MIPs ont d'abord été synthétisés en utilisant différents monomères fonctionnels qui ont été choisis selon les arguments suivants :
 - Le monomère acide méthacrylique (MAA) est le monomère le plus utilisé pour fabriquer des MIPs, ces derniers étant utilisés en extraction en phase solide (tableau 3.1).
 - Les monomères N, N-méthylène bisacrylamide (MBAA) et acrylamide (ACR) sont les monomères qui ont les énergies d'interaction les plus élevées avec le phosmet selon les résultats de modélisation informatique (tableau 3.2).
- Le choix du solvant porogène pour les trois monomères fonctionnels s'est porté sur le toluène qui est le solvant le plus utilisé pour la synthèse des MIPs dédiés à une application de type MISPE (tableau 3.1).
- La réticulation pour tous ces MIPs a été assurée par l'éthylène glycol diméthacrylate (EGDMA), agent réticulant le plus couramment utilisé (tableau 3.1).
- Le 2,2'-azobis (2-méthylpropionitrile) (AIBN) a été utilisé comme initiateur (ou promoteur, il donne deux composés radicalaires par voie thermique ou U.V et est très largement utilisé dans la synthèse de MIPs (tableau 1.3).

La synthèse des MIPs a été réalisée en se basant sur le travail décrit dans la thèse de M. Idriss Bakas (Bakas, 2012). Cette méthode est présentée dans le chapitre « matériels et méthodes » (paragraphe b-1).

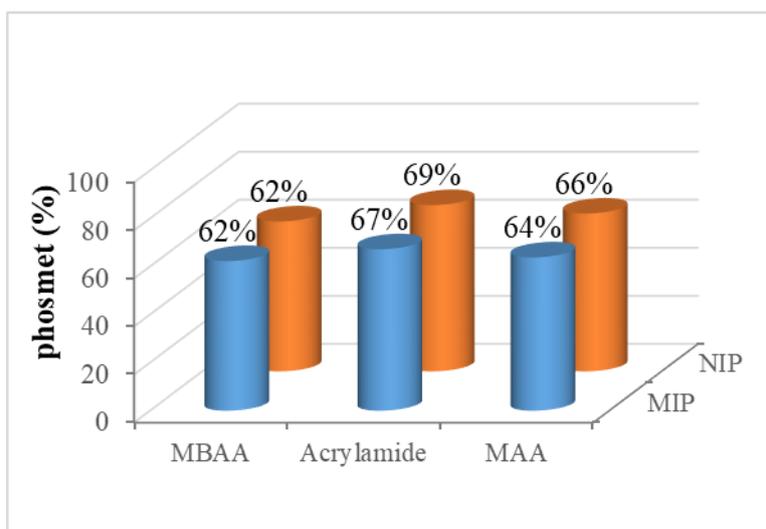
Chapitre 3 : Résultats et discussion

c) Etude de la rétention du phosmet sur les différents polymères synthétisés

La méthode de rétention du phosmet sur MISPE (chapitre 2 « matériels et méthodes ») a été réalisée afin de tester la sélectivité des MIPs qui ont été synthétisés en utilisant chacun des monomères fonctionnels (MAA, MBAA et ACR) et le toluène comme solvant porogène.

0,5 mL de phosmet à 5.10^{-6} M ou 1 mL de phosmet à 1.10^{-5} M ont été préparés dans l'ACN et les solutions obtenues ont été percolées à travers des cartouches de MIP et NIP. L'éluat a été réalisé par 3 mL d'acétate d'éthyle puis l'éluat a été analysé par HPLC (Fig. 3.1).

a)



b)

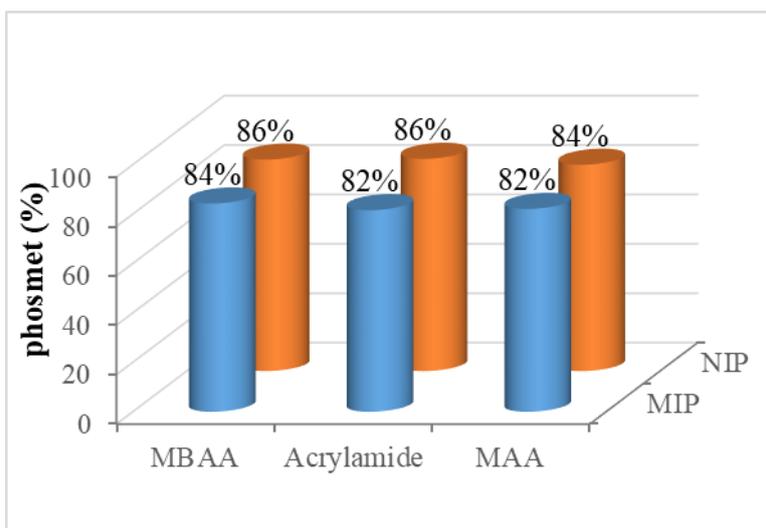


Figure 3.1. Taux de recouvrement obtenus pour les NIPs et MIPs préparés à partir de chaque monomère fonctionnel.

a) dépôt de 0,5ml du phosmet 5.10^{-6} M, b) dépôt de 1ml de phosmet 10^{-5} M.

Chapitre 3 : Résultats et discussion

Les résultats présentés dans la figure 3.1 montrent qu'il n'y a pas de différence entre MIP et NIP quels que soient le monomère fonctionnel utilisé et la quantité de phosmet déposée.

Ces résultats conduisent à conclure que les MIPs synthétisés précédemment ne sont pas sélectifs et ne contiennent pas de cavités spécifiques du phosmet. Les interactions entre la molécule cible (phosmet) et le monomère fonctionnel semblant insuffisantes, nous avons opté pour un changement de solvant porogène, ce dernier influençant par sa polarité la capacité d'établir des liaisons hydrogène et la force de l'interaction entre la molécule cible et le monomère fonctionnel (Sellergren & Shea, 1993b).

Nous avons donc dans un premier temps étudié la force d'interaction entre le phosmet et les différents monomères fonctionnels dans différents solvants porogènes. Pour cela, nous avons opté pour une méthode originale et peu coûteuse basée sur l'utilisation d'un biocapteur à acétylcholinestérase.

3.1.2. Approche alternative mettant en jeu un biocapteur à AChE

L'approche choisie dans ce travail pour étudier l'interaction phosmet- monomère fonctionnel est basée sur l'utilisation d'un biocapteur à acétylcholinestérase. Cette enzyme est fortement inhibée par les insecticides organophosphorés, qui agissent en se fixant de manière irréversible en estérifiant une sérine du site actif. Le monomère fonctionnel formant un complexe avec le phosmet, nous avons émis comme hypothèse que les propriétés inhibitrices de ce dernier pouvaient être modifiées (Fig. 3.2).

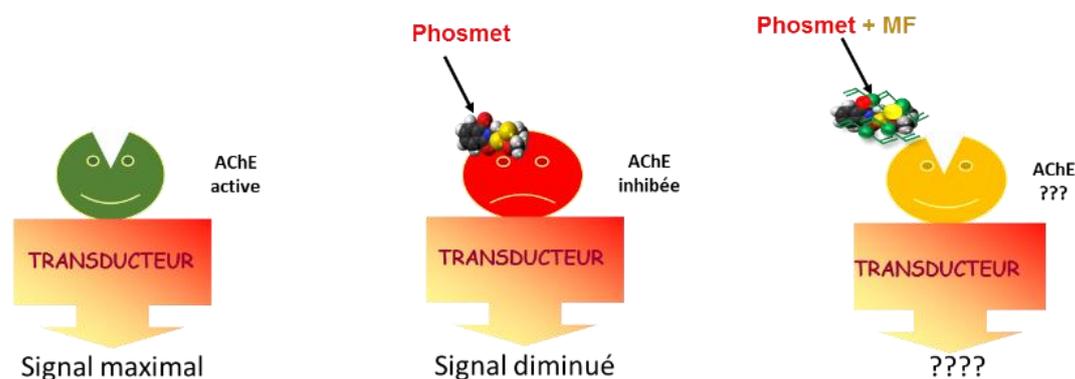


Figure 3.2. Influence présumée du complexe phosmet- monomère fonctionnel sur le signal issu du biocapteur à acétylcholinestérase.

Chapitre 3 : Résultats et discussion

Nous avons utilisé dans cette étude un biocapteur disponible au laboratoire (Thèse Georges Istamboulié) basé sur une enzyme modifiée génétiquement qui a été développée par l'équipe du Professeur Didier Fournier (Université Toulouse III Paul Sabatier) (Stojan *et al.*, 2008 ; Siadat *et al.*, 2006).

La procédure de détection est la suivante :

- En absence de l'inhibiteur (organophosphorés), l'intensité du signal mesuré est maximale (I_0).
- En présence de l'inhibiteur, l'intensité du signal diminue (I_f). Le pourcentage d'inhibition augmente de manière logarithmique avec l'augmentation de la concentration de l'inhibiteur.
- En présence du complexe phosmet-monomère fonctionnel, on observe une diminution d'inhibition de l'enzyme, ce phénomène peut s'expliquer par une accessibilité réduite du phosmet vers le site actif (Dvir *et al.*, 2010).

- Dans un premier temps, nous avons utilisé le biocapteur pour sélectionner le solvant le plus approprié favorisant les interactions entre le monomère fonctionnel et le phosmet.

- Nous avons ensuite synthétisé plusieurs polymères dans différentes conditions de polymérisation en utilisant le solvant porogène sélectionné par biocapteur

- Enfin, nous avons comparé des polymères synthétisés à partir des trois agents réticulants (EGDMA, DVB, TRIM) les plus utilisés dans la bibliographie.

Une partie de ce travail est incluse dans l'article publié dans le journal Talanta, qui est joint en fin de ce mémoire (Aftim *et al.*, 2017).

a) Sélection du monomère fonctionnel et du solvant porogène

a.1) Effet du phosmet préparé dans différents solvants sur la performance analytique du biocapteur

La stabilité opérationnelle du capteur a été évaluée afin de s'assurer que la diminution du signal pendant les mesures d'inhibition est due à l'interaction de l'enzyme par le phosmet, et non à la diffusion de l'enzyme ou son inactivation par le N-bromosuccinimide (NBS) contenu dans le tampon. Nous n'avons pas observé de diminution de la réponse du capteur pendant au moins 20 mesures.

Ensuite, l'effet de chacun des trois monomères fonctionnels sélectionnés (MBAA, ACR et IA) préparés dans chacun des solvants choisis (ACN, DMF et DMSO) sur la réponse du biocapteur

Chapitre 3 : Résultats et discussion

a été testé. On a constaté que les monomères fonctionnels et les solvants porogènes pré-sélectionnés n'avaient aucun effet de dénaturation ou d'inhibition sur l'AChE.

L'effet sur la réponse du biocapteur du phosmet préparé dans trois solvants différents (ACN, DMF, DMSO) est présenté dans la figure 3.3.

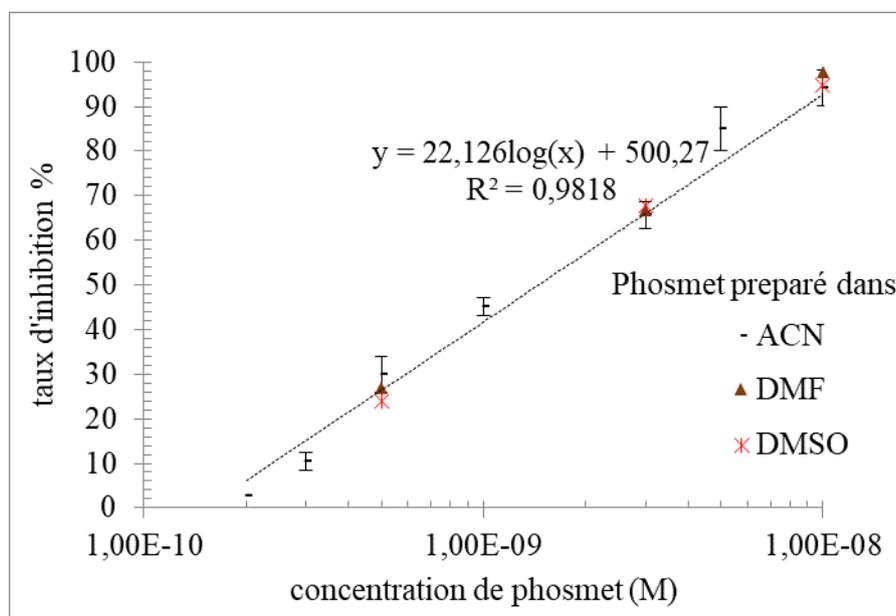


Figure 3.3. Inhibition du capteur à AChE par le phosmet préparé dans chacun des trois solvants (ACN, DMF, DMSO).

Les résultats présentés en représentation semi-log montrent une réponse linéaire ($R^2=0,99$, $n=3$) dans le domaine de concentrations étudié (2.10^{-10} M à 10^{-8} M). La limite de détection du capteur est de 2.10^{-10} M, ce qui correspond à une concentration initiale de phosmet de 2.10^{-8} M (injection de 100 μ L dans 10 mL). On peut observer que l'inhibition du phosmet ne varie pas en fonction du solvant utilisé (Fig. 3.3).

a.2) Effet du complexe phosmet/monomère fonctionnel (pré-polymère) sur le biocapteur en fonction du solvant porogène utilisé

L'effet du complexe de phosmet (0,032 M) avec le monomère fonctionnel (0,128 M) (ratio molaire 1:4) a été étudié sur le capteur à AChE après une étape de pré-incubation de 30 min à 20°C. La figure 3.4 représente la diminution du pourcentage d'inhibition obtenue avec chaque monomère fonctionnel (MBAA, ACR et IA) dans chacun des trois solvants porogènes (ACN, DMF et DMSO), la concentration finale de phosmet injecté dans la cellule étant de 10^{-8} M.

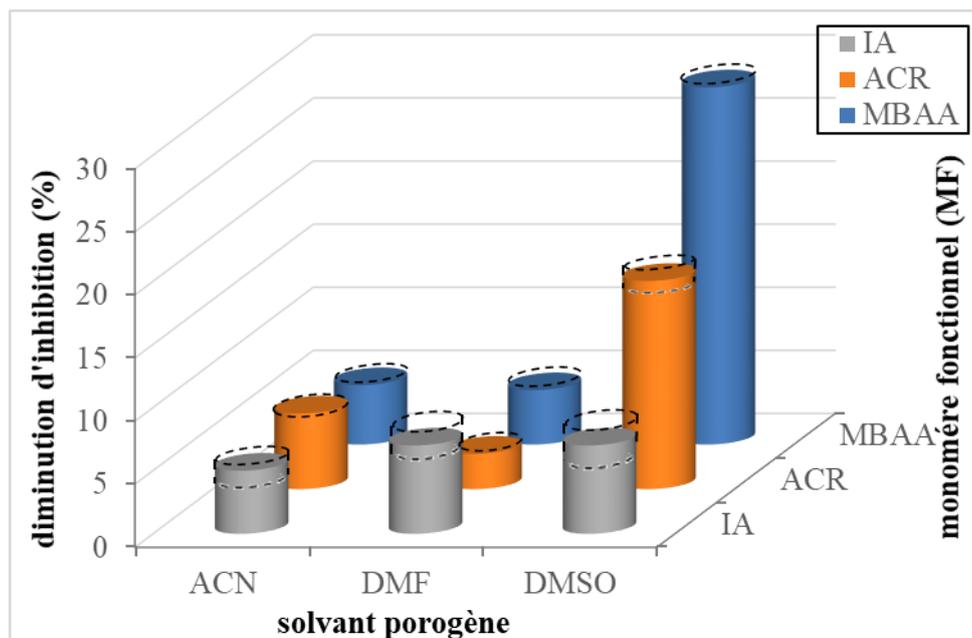


Figure 3.4. Effet de la nature du monomère fonctionnel et du solvant porogène sur l'inhibition du capteur à AChE. Les résultats sont exprimés en pourcentage de diminution du taux d'inhibition.

Les résultats montrent une diminution importante de l'inhibition du capteur à AChE lorsque le DMSO est utilisé comme solvant, quel que soit le monomère fonctionnel utilisé. Cependant, la plus forte diminution a été obtenue en utilisant le MBAA comme monomère fonctionnel, suggérant que l'interaction phosmet-MBAA était suffisamment forte pour empêcher l'accès ou la liaison du phosmet au site actif de l'enzyme AChE. Ces observations sont en accord avec les résultats obtenus lors de la modélisation informatique des interactions monomère fonctionnel-phosmet.

a.3) Effet du temps de contact entre le phosmet et le monomère fonctionnel sur l'inhibition du capteur à AChE

L'effet du temps d'incubation sur l'interaction phosmet-MF (ratio molaire 1:4) à 20°C a été étudié pour tous les monomères fonctionnels pré-sélectionnés en utilisant le DMSO comme solvant porogène. La figure 3.5 montre une faible évolution de la baisse d'inhibition après 30 minutes de contact, suggérant que ce temps de contact est suffisant pour l'établissement du complexe entre le phosmet et les monomères fonctionnels.

Par ailleurs, cette expérience permet de confirmer que parmi les trois monomères fonctionnels testés, le MBAA montre l'interaction la plus forte avec le phosmet, qui se traduit par une diminution de 30% de l'inhibition de la réponse du capteur à AChE.

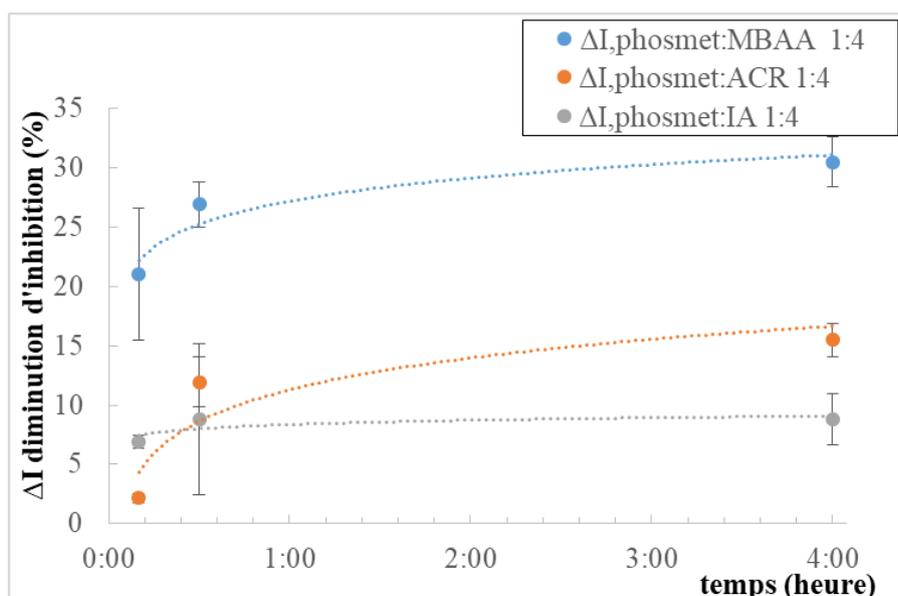


Figure 3.5. Effet du temps d'incubation du phosmet avec le monomère fonctionnel (MBAA, ACR, ou IA) (ratio molaire 1:4 dans le DMSO) sur l'inhibition du capteur à AChE. Les résultats sont exprimés en pourcentage de diminution du taux d'inhibition.

a.4) Effets du MBAA et de l'ACR utilisés aux ratios molaires de 1:4 et 1:8

Le MBAA étant un monomère bi-fonctionnel et l'ACR mono-fonctionnel (Fig. 3.6), nous avons comparé leurs effets sur le phosmet aux ratios respectifs 1:4 et 1:8, ceci afin d'avoir un rapport égal entre les groupements acrylamide et le phosmet. Ces expériences ont été réalisées à 20°C en utilisant comme solvant le DMSO. Les résultats sont présentés dans la figure 3.7.

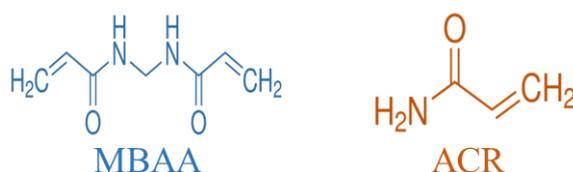


Figure 3.6. Structures chimiques du N,N'-méthylènebisacrylamide (MBAA) (bi-fonctionnel) et l'acrylamide (ACR) (mono-fonctionnel).

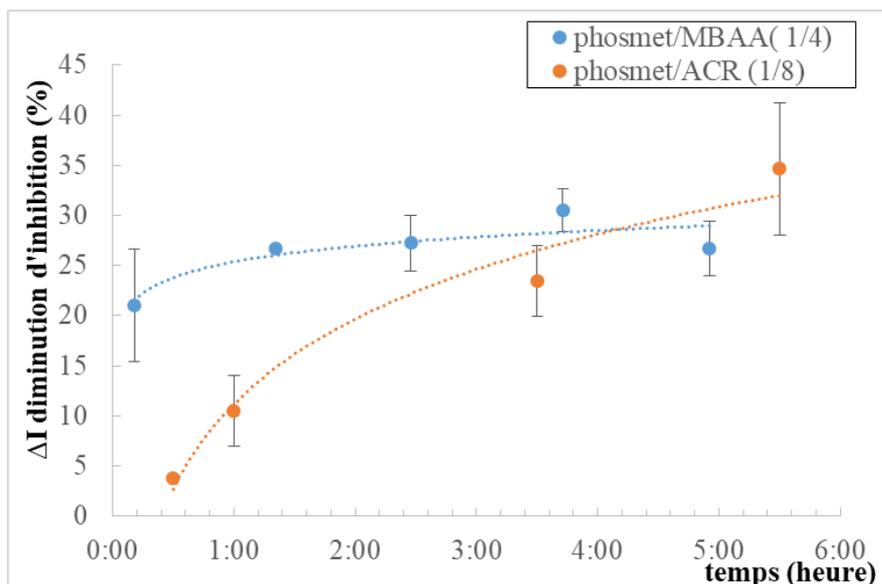
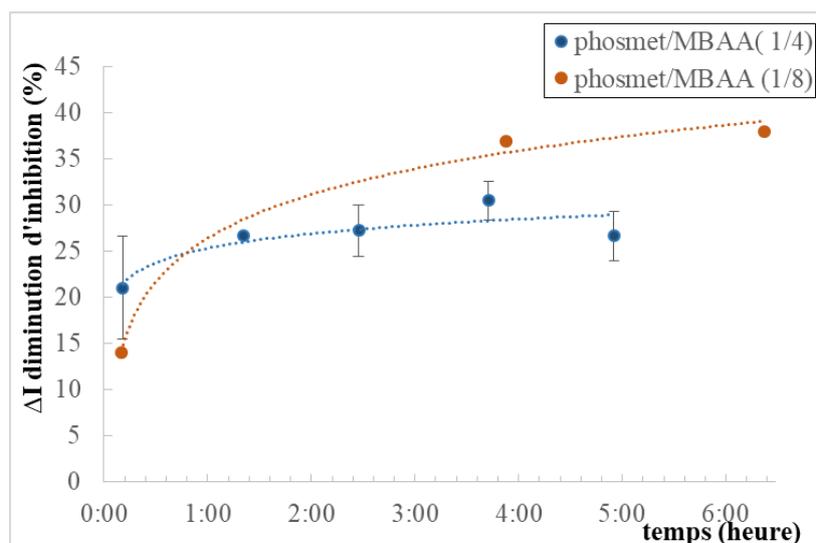


Figure 3.7. Effet du temps d'incubation phosmet/MBAA et phosmet/ACR aux ratios molaires respectifs 1:4 et 1:8 sur l'inhibition du capteur à AChE. Les résultats sont exprimés en pourcentage de diminution du taux d'inhibition.

- On peut observer sur la figure 3.7 que, dans les conditions prédéfinies, le complexe phosmet-MBAA se forme plus rapidement que le complexe phosmet-ACR. Ce résultat nous a donc amenés à comparer l'effet du temps de l'incubation du phosmet avec le MBAA et l'ACR aux ratios molaires 1:8 et 1:4, les résultats sont présentés sur la figure 3.8. On observe que l'utilisation du MBAA à un ratio molaire double conduit à augmenter la quantité de complexe formé, mais n'accélère pas la vitesse de formation de ce dernier (Fig. 3.8.a). La même observation peut être faite en ce qui concerne le complexe phosmet/ACR (Fig. 3.8.b).

Chapitre 3 : Résultats et discussion

a)



b)

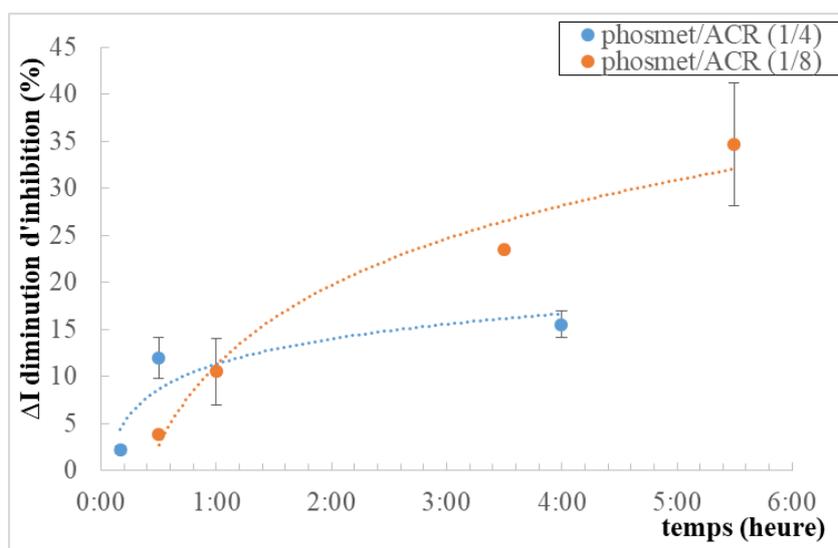


Figure 3.8. Effet du temps d'incubation entre phosmet et MBAA (a), et phosmet et ACR (b), utilisés aux ratios molaires 1:4 et 1:8, sur l'inhibition du capteur à AChE. Les résultats sont exprimés en pourcentage de diminution du taux d'inhibition.

La figure 3.9 compare les effets des complexes et phosmet/MBAA et phosmet/ACR utilisés au ratio molaire 1:8 en fonction du temps de contact (pré-incubation). Les résultats obtenus montrent que la diminution d'inhibition atteint une valeur maximale d'environ 40% quel que soit le monomère fonctionnel utilisé, confirmant que l'effet complexant de ce dernier sur le phosmet ne dépend pas des groupements fonctionnels acrylamide. On peut également observer que les vitesses de formation des deux complexes sont similaires, un équilibre étant atteint entre 5 et 6 h de contact.

Chapitre 3 : Résultats et discussion

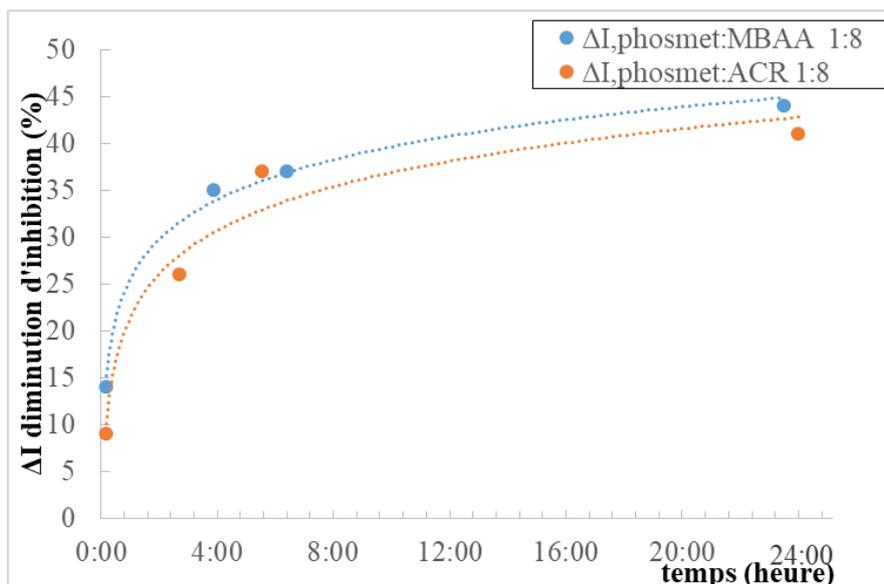


Figure 3.9. Effet du temps de contact entre le phosmet et les monomères MBAA et ACR (ratio molaire 1:8 dans le DMSO) sur l'inhibition du capteur à AChE. Les résultats sont exprimés en pourcentage de diminution du taux d'inhibition.

L'influence de la température sur la vitesse de complexation et l'effet inhibiteur a été étudiée sur le complexe phosmet-ACR utilisé au ratio 1:8. La figure 3.10 montre peu de différence, compte tenu des erreurs relatives, entre l'effet du complexe phosmet-ACR formé à 10°C et 20°C, un équilibre étant atteint après 5h30 d'incubation.

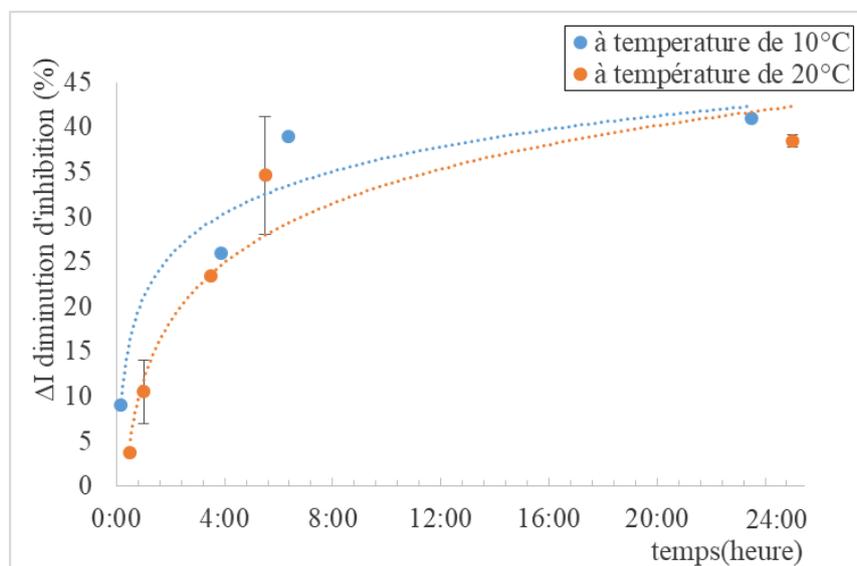


Figure 3.10. Effet de la température sur la cinétique d'inhibition du complexe phosmet-MBAA au ratio molaire 1:8 dans le DMSO sur l'inhibition. Les résultats sont exprimés en pourcentage de diminution du taux d'inhibition.

Chapitre 3 : Résultats et discussion

En conclusion de cette partie, la méthode par biocapteur développée nous a permis d'étudier pour la première fois la cinétique de l'interaction entre le phosmet et différents monomères fonctionnels, en fonction du solvant porogène utilisé, aux ratios molaires 1:4 et 1:8, et à deux températures (10°C, 20°C).

- Les résultats obtenus sont en bonne corrélation avec ceux résultant de la simulation informatique, qui a proposé le MBAA comme le monomère fonctionnel qui interagit le plus favorablement avec le phosmet. Les essais basés sur l'utilisation de l'acrylamide (ACR) à un ratio molaire doublé (1:8) n'ont pas donné de meilleurs résultats.
- Le DMSO s'est avéré être le solvant qui favorise le plus les interactions entre le phosmet et les trois monomères fonctionnels testés. Ce résultat confirme la classification de Sellergren qui stipule que l'augmentation de la polarité du solvant favorise la rétention sur MIPs des molécules hydrophobes de faible polarité (Sellergren, 1999). Ainsi, on sait que le meilleur solvant pour une rétention sélective dans le MIP est le solvant porogène qui est utilisé pendant la synthèse des MIPs (Pichon, 2007).
- Enfin, l'utilisation d'un ratio molaire 1:8 s'est traduite par un allongement du temps de pré-incubation nécessaire pour atteindre l'équilibre.

Afin de synthétiser les MIPs sélectifs du phosmet, nous avons donc tout d'abord utilisé le MBAA comme monomère fonctionnel à un ratio molaire phosmet/MBAA de 1:4 et le DMSO comme solvant porogène.

b) Synthèse des polymères en masse et par précipitation

Différentes conditions de synthèse ont été testées, notamment en ce qui concerne le volume de solvant porogène (1 mL ou 5 mL), le rapport molécule empreinte/réticulant (EGDMA) (1:20 ou 1:25), la quantité de l'initiateur AIBN (10 mg ou 14 mg) et enfin la température de synthèse (70°C ou 60°C). Toutes les conditions utilisées sont présentées dans le tableau 3.3. Les polymérisations ont toutes été réalisées avec 0,162 mmol de phosmet comme molécule empreinte, celle-ci étant absente des NIP, et avec 0,648 mmol de monomère fonctionnel (rapport molaire 1:4). La durée de pré-incubation entre le phosmet et le MBAA a été fixée à 1 h, et la réaction de la polymérisation a été réalisée en 19 h ou 20 h.

Chapitre 3 : Résultats et discussion

Tableau 3.3. Conditions de synthèse des polymères (MIPs et NIPs).

Polymère	EGDMA (mmol)	Volume de solvant (DMSO) (mL)	AIBN (mg)	Durée réaction (h)	Temp. (°C)
1	3,24	1	10	20	70
2	3,24	5	10	20	70
3	4,24	5	10	20	70
4	4,24	5	14	20	70
5	4,24	5	14	19	70
6	4,24	5	14	19	60

Le volume de solvant porogène (1 mL), le rapport molaire entre la molécule empreinte et l'agent réticulant (1:20), la quantité d'initiateur (10 mg) ont été choisis dans un premier temps en se basant sur les travaux de thèse de M. Idriss Bakas (Bakas, 2012). Cependant, un certain nombre de modifications ont été réalisées par la suite :

- Le rapport phosmet/ agent réticulant (EGDMA) a été augmenté de 1:20 à 1:25 afin d'obtenir une meilleure réticulation avec le MBAA qui est un monomère bi-fonctionnel (deux doubles liaisons) ;
- La quantité de l'initiateur a été portée à 1,5% de la somme de la masse du monomère fonctionnel et de l'agent réticulant (Piletska *et al.*, 2005b) ;
- Le point de fusion du phosmet étant de 72°C, nous avons abaissé la température de polymérisation de 80°C à 70°C. Nous avons également réalisé des essais à 60°C dans le but de limiter la vitesse de réaction pour plus de contrôle, cette température étant minimale pour l'amorçage de l'AIBN (Bayle Alpin, 2008).
- Le volume de solvant porogène a été augmenté de 1 mL à 5 mL, en se basant sur les conditions utilisées lors de la sélection du monomère fonctionnel (MF) et du solvant porogène les plus appropriés. En effet, le volume de solvant porogène affecte la densité et la qualité des sites de reconnaissances. Lorsque celui-ci est faible, la formation de la polymérisation est trop rapide et le polymère ainsi obtenu est très dense, ce qui ne constitue pas un bon MIP. Lorsqu'il est trop élevé, la dilution de la solution conduit à un polymère irrégulièrement imprimé présentant beaucoup de défauts. (Song *et al.*, 2009). Nous avons observé que l'utilisation de 1 mL de solvant porogène (DMSO) conduisait à la formation d'un polymère dur et craquelé alors que l'emploi de 5 mL du même solvant a conduit à une pâte blanche facilement manipulable à la spatule. Dans les deux cas, aucune trace de solvant résiduel n'était observable autour de ce solide.

Chapitre 3 : Résultats et discussion

Une fois les synthèses effectuées, les polymères synthétisés en présence de 1 mL de DMSO ont été broyés au mortier et tamisés successivement sur des tamis de 100 μm et 45 μm . Les fractions de 45 et 100 μm ont été récupérées pour éliminer le phosmet par extraction au Soxhlet selon la procédure citée dans le chapitre 2, paragraphe b-3. Par contre, les polymères synthétisés en présence de 5 mL de DMSO ont été séchés à 60°C dans une étuve puis le phosmet directement éliminé par extraction au Soxhlet (les étapes de broyage et tamisage sont rendues impossibles en raison de la très petite taille des particules (moins de 45 μm)). Les polymères ont été séchés à 60°C dans une étuve.

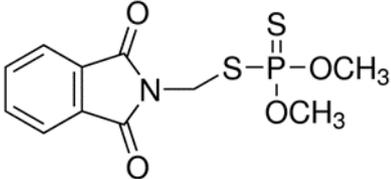
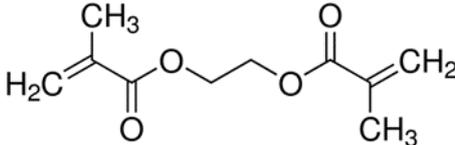
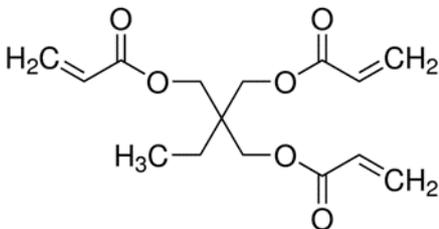
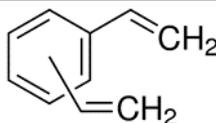
c) Mise en évidence en batch des empreintes réalisées à partir de différents agents de réticulation

Généralement, l'adsorption de la molécule cible à la surface du polymère (MIP ou NIP) obéit aux mêmes règles que l'adsorption des composés organiques sur du carbone greffé avec des groupements fonctionnels. Ces mécanismes d'adsorption dépendent de divers facteurs, notamment :

- La structure et la surface des pores du carbone activé.
- La présence de groupes fonctionnels acides ou basiques à la surface du carbone.
- La polarité et la solubilité des solvants et des molécules à adsorber respectivement.
- La polarité de la surface du carbone influence considérablement l'adsorption des polluants organiques (Goto *et al.*, 2015)

Les agents de réticulation les plus utilisés de synthèse des MIPs ainsi que leurs caractéristiques physico-chimiques sont répertoriés dans le tableau 3.4. Le DVB est l'agent de réticulation qui présente la plus grande hydrophobicité, l'EGDMA est le plus polaire, alors que le TMPTA présente un coefficient de partage proche de celui du phosmet. Toutefois il apparaît qu'aucun des agents de réticulation utilisés n'est capable d'établir des liaisons hydrogène avec le phosmet. On observe aussi que la structure chimique du TMPTA présente 3 doubles liaisons, alors que l'EGDMA et le DVB n'en comptent que 2. D'autre part, le DVB semble être l'agent de réticulation le plus susceptible d'échanger des interactions hydrophobes avec le phosmet.

Tableau 3.4. Caractéristiques physico-chimiques du phosmet et des différents agents de réticulation.

Nom	Structure chimique 2D	Log K _{ow}	Groupements accepteurs de liaisons hydrogène	Groupements donateurs de liaisons hydrogène	Reference
Phosmet		2,95	6	0	Pubchem
Ethylène glycol diméthacrylate (EGDMA)		1,87	4	0	Pubchem
Triméthyl propane triacrylate (TMPTA)		2,48-2,75	6	0	Edelbach and Lodge
Divinylbenzène (DVB)		3,9-4,4	0	0	Meyland and Howard, 1997

Dans l'étude qui suit le but sera d'étudier l'effet de la polarité du solvant utilisé sur l'adsorption du phosmet par les polymères synthétisés à partir des trois agents de réticulation. Les isothermes d'adsorption seront ensuite déterminées en « batch », sous agitation, et les résultats seront confrontés aux théories d'adsorption de Langmuir et Freundlich.

c.1) Choix du solvant utilisé pour tester la capacité d'adsorption

Les expériences de sélectivité menées dans les conditions d'équilibre donnent une idée de la sélectivité absolue des MIPs. Les liaisons hydrogène constituant les principales interactions entre molécule cible et polymère, la mobilisation de ces liaisons par certains solvants peut modifier considérablement les interactions. Le choix du solvant est donc primordial pour améliorer l'efficacité de l'adsorption de la molécule cible dans les cavités du MIPs et minimiser les interactions non spécifiques entre la molécule cible et les groupements présents à la surface du polymère.

Chapitre 3 : Résultats et discussion

Ces interactions qualifiées d'adsorption non spécifique proviennent de la présence de monomères fonctionnels placés aléatoirement dans le polymère, comme dans les NIPs ; elles sont favorisées par l'utilisation de forts excès en monomères fonctionnels (Joshi *et al.*, 2000). La sélection du solvant favorisant une sélectivité optimale du MIP pour le phosmet est donc une étape essentielle pour réaliser les expériences d'adsorption en batch. En général, le solvant utilisé pour tester l'adsorption est le solvant porogène qui est utilisé pendant la synthèse (Claude, 2007). Dans notre cas, c'est le DMSO qui a été utilisé comme solvant porogène pour la synthèse des MIPs. Toutefois, en raison de sa forte densité (1,1) et son point d'ébullition élevé (189°C), ce solvant est peu adapté à l'extraction en phase solide car il est difficile à éliminer. D'autre part, dans l'optique de l'application à l'extraction du phosmet de l'huile d'olive, il est important de trouver un solvant miscible avec cette matrice, ce qui n'est pas le cas du DMSO. Dans une première approche nous avons donc sélectionné comme solvant de dépôt l'hexane, solvant apolaire miscible à l'huile d'olive (Kaparathi & Chari, 1959). Des solutions de phosmet ont donc été préparées dans l'hexane, de concentrations comprises entre 43 mg.L⁻¹ et 304 mg.L⁻¹, puis 10 mL de ces solutions ont été mis en présence de 10 mg de polymères (MIP ou NIP) préparés à base d'EGDMA (polymère n°6 tableau 3.3). Après 24 h d'agitation, les solutions ont été analysées par HPLC afin de déterminer la quantité de phosmet adsorbé. La capacité d'adsorption (exprimée en mg de phosmet par g de polymère) a été calculée, permettant de représenter les isothermes d'adsorption des MIP et NIP (Fig. 3.11).

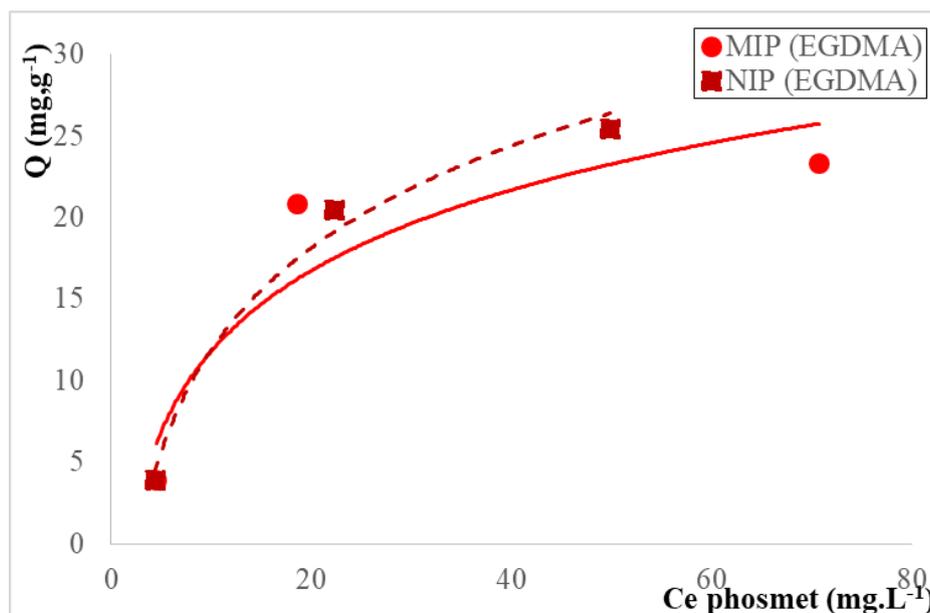


Figure 3.11. Isothermes d'adsorption des MIP et NIP synthétisés en utilisant l'EGDMA comme agent réticulant (ratio molaire 1:4:25), déterminés en présence de solutions de phosmet préparées dans l'hexane.

Chapitre 3 : Résultats et discussion

Les résultats montrent que la capacité d'adsorption des polymères (MIP et NIP) augmente au fur et à mesure que la concentration de phosmet croît, jusqu'à l'obtention d'un plateau indiquant la saturation des polymères. On n'observe aucune différence de comportement entre MIP et NIP en utilisant l'hexane comme solvant, probablement car ce solvant n'est pas capable d'éliminer l'adsorption non spécifique du phosmet sur les polymères (MIP ou NIP). Pour éliminer ce phénomène d'adsorption non spécifique, nous avons choisi d'associer l'hexane à un solvant plus polaire comme l'éthanol. Bien que les solvants polaires suppriment l'adsorption non spécifique, ils rivalisent également avec le soluté pour les sites d'adsorption sur le polymère et peuvent donc réduire l'absorption (Joshi *et al.*, 2000).

c.2) Influence du ratio éthanol /hexane sur la rétention du phosmet sur des polymères synthétisés à partir de chaque agent de réticulation

L'éthanol a été choisi car il s'agit du solvant le plus polaire qui soit miscible à l'hexane (Kaparthi & Chari, 1959), il possède également un site receveur et un site donneur d'hydrogène. Nous avons donc étudié l'effet du pourcentage d'éthanol dans le mélange éthanol/hexane sur l'interaction non spécifique des MIPs synthétisés en utilisant les trois agents de réticulation sélectionnés (EGDMA, DVB et TMPTA). Les polymères ont été synthétisés en observant un ratio molaire de 1:4:25 entre phosmet, MBAA et agent réticulant. Les polymères obtenus sont nommés MIP_{EGDMA}, MIP_{DVB} et MIP_{1TMPTA}. Toutefois, le TMPTA étant un réticulant trifonctionnel, nous avons synthétisé un deuxième polymère appelé MIP_{2 TMPTA} en utilisant un ratio molaire 1:4:17.

10 mg de chaque polymère ont été mis en contact avec 20 mL de solution de phosmet à $5 \cdot 10^{-5}$ M préparé dans un mélange éthanol/hexane sous agitation magnétique. Le surnageant a été analysé après 24 h d'agitation et la capacité d'adsorption a été calculée. La figure 3.12 présente la capacité d'adsorption ainsi que le facteur d'empreinte obtenu pour chaque polymère en fonction du taux d'éthanol utilisé dans le solvant (éthanol/hexane).

Chapitre 3 : Résultats et discussion

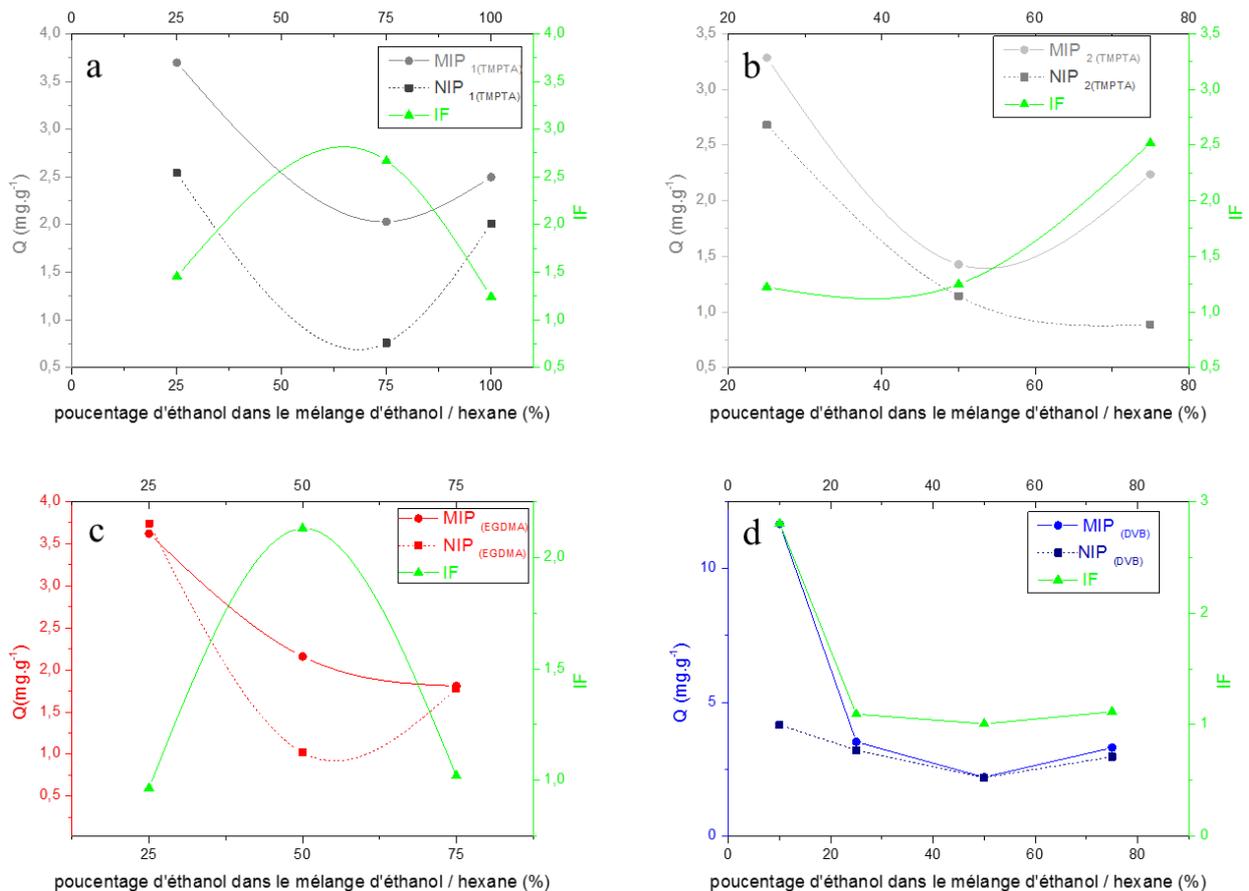


Figure 3.12. Capacité d'adsorption Q (axe de gauche) et facteur d'empreinte (IF) (axe de droite) des polymères MIP et NIP synthétisés avec différents agents de réticulation : (a) TMPTA au ratio 1:4:25, (b) TMPTA au ratio 1:4:17, (c) EGDMA au ratio 1:4:25, et (d) DVB au ratio 1:4:25. Evolution en fonction du pourcentage d'éthanol utilisé dans le mélange éthanol/hexane.

Plusieurs remarques peuvent être faites à partir de ces résultats :

- La capacité d'adsorption diminue lorsque le taux d'éthanol augmente dans le mélange éthanol/hexane jusqu'à environ 50%. Ce résultat est en accord avec d'autres travaux publiés dans la littérature (Hu *et al.*, 2005). Ce phénomène s'explique par le fait que l'éthanol peut facilement former des liaisons hydrogènes et interférer avec l'établissement de liaisons entre les groupements fonctionnels du phosmet (C=O et O-CH₃) et du MBAA (N-H) sur la surface des polymères (MIP ou NIP) (He *et al.*, 2007).
- Au-delà de 50% d'éthanol, on observe une augmentation de la capacité d'adsorption des polymères synthétisés à partir de TMPTA. Ce phénomène pourrait être attribué à la faible polarité du phosmet, qui en présence d'un fort taux d'éthanol favorise les interactions hydrophobes entre ce dernier et la matrice de polymère (MIP ou NIP). Ce phénomène a déjà été observé lors de l'étude de la capacité d'adsorption sur MIP d'un autre organophosphoré, le diméthoate (Lv *et al.*, 2008).

Chapitre 3 : Résultats et discussion

- Aux forts pourcentages en éthanol (75 à 100 %), l'adsorption du phosmet sur MIP ne disparaît pas et reste comparable à celle observée sur NIP. Cela suggère que l'interaction hydrophobe joue un rôle essentiel dans les interactions non spécifiques dans ces polymères, alors que les interactions spécifiques impliquent des liaisons hydrogènes entre les groupes aminés (N-H) du monomère fonctionnel (MBAA) et les groupements carboxyle et alcoyle du phosmet. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus lors de l'étude de la capacité d'adsorption de quinones sur MIP et NIP (He *et al.*, 2007). Dans cette étude, il a été observé que lorsque le pourcentage d'eau dans l'acétonitrile augmente, la capacité d'adsorption des polymères diminue jusqu'à un certain seuil puis croît de nouveau. Ce phénomène a été attribué aux interactions hydrophobes qui contribuent principalement à l'interaction non spécifique entre la molécule cible et le matrice du polymère (He *et al.*, 2007).

Les facteurs d'empreinte obtenus pour chaque MIP synthétisé à partir de TMTPA, EGDMA et DVB sont présentés dans le tableau 3.5, en fonction du pourcentage d'éthanol contenu dans l'hexane.

Tableau 3.5. Valeurs de facteurs d'empreinte (IF) des quatre MIPs synthétisés en fonction du pourcentage d'éthanol contenu dans le mélange éthanol/hexane.

Pourcentage d'éthanol %	10	25	50	75	100
IF_{1TMPTA}		1,5		2,7	1,3
IF_{2TMPTA}		1,2	1,3	2,5	
IF_{EGDMA}		0,97	2,13	1	
IF_{DVB}	2,8	1,09	1	1,1	

- Les meilleurs facteurs d'empreinte sont de 2,8, 2,7, 2,5 et 2,13, ils ont été obtenus respectivement avec les MIPs synthétisés à partir de DVB, TMPTA1, TMPTA2 et EGDMA.

- Ces facteurs d'empreinte ont été obtenus en utilisant des ratios éthanol/hexane de 75:25 pour les MIP_{TMPTA1} et MIP_{TMPTA2} , 50:50 pour le MIP_{EGDMA} et 10:90 pour le MIP_{DVB} . On peut constater que le taux d'éthanol nécessaire pour obtenir le meilleur facteur d'impression dépend de de l'agent de réticulation utilisé. Ainsi, le MIP_{DVB} , très hydrophobe, présente des caractéristiques optimales ($IF=2,8$) en utilisant seulement 10% d'éthanol, alors que les MIP_{EGDMA} , très polaires, ont un rendement optimal ($IF=2,13$) en présence de 50% d'éthanol. En revanche, MIP_{TMPTA} , de polarité similaire au phosmet, présente des caractéristiques optimales ($IF= 2.2-2.7$) en présence de 75% d'éthanol.

Chapitre 3 : Résultats et discussion

- Les facteurs d'empreinte obtenus pour les quatre polymères étant assez proches, nous avons évalué la capacité des MIPs et NIPs en batch en utilisant le ratio hexane/éthanol approprié à chaque polymère afin de dresser les isothermes d'adsorption.

c.3) Etude des isothermes d'adsorption

L'étude des propriétés d'adsorption comprend tout d'abord une étude de cinétique d'adsorption qui permet de déterminer le temps de contact nécessaire entre le polymère (MIP ou NIP) et la solution de phosmet pour atteindre l'adsorption maximale.

Pour cela, 10 mg de polymère ont été mis en agitation dans 20 mL de solution de phosmet à 5.10^{-5} M dilué dans un mélange d'éthanol/hexane dont le ratio a été optimisé pour chaque polymère dans le paragraphe précédent (75:25 pour MIP₁TMPTA et MIP₂TMPTA, 50:50 pour MIP_{EGDMA} et 10 : 90 pour MIP_{DVB}). La concentration résiduelle de phosmet dans le surnageant a été mesurée toutes les 2h pour des temps de contact compris entre 0 et 24h, puis la capacité d'adsorption de chaque polymère a été déterminée (chapitre 2). Les cinétiques obtenues sont représentées pour chacun des quatre polymères testés dans la figure 3.13 (a, b, c, d).

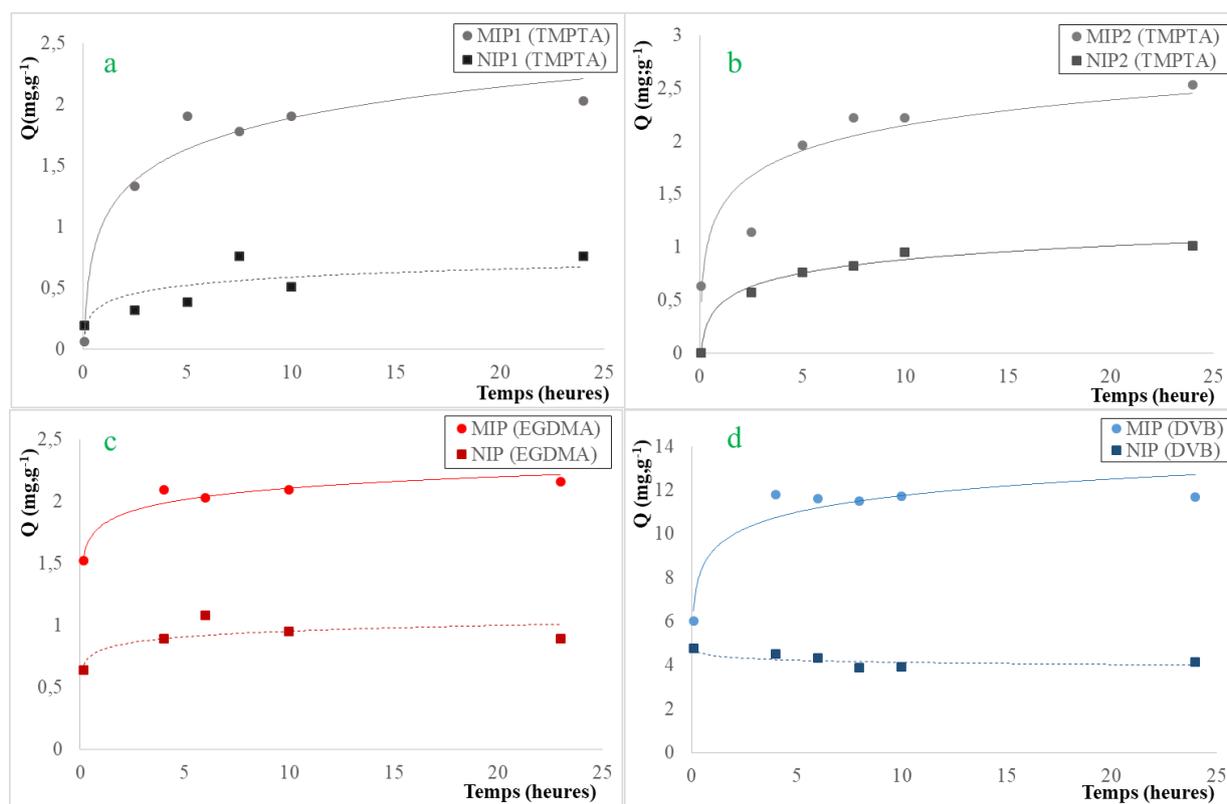


Figure 3.13. Capacité d'adsorption des MIPs et NIPs synthétisés, déterminée en présence de phosmet à 5.10^{-5} M dans un mélange éthanol/hexane approprié (a) MIP₁TMPTA et NIP₁TMPTA (ratio 1:4:25) (b) MIP₂TMPTA et NIP₂TMPTA (ratio 1:4:17), (c) MIP_{EGDMA} et NIP_{EGDMA} (ratio 1/4/25), et (d) MIP_{DVB} et NIP_{DVB} (ratio 1/4/25).

Chapitre 3 : Résultats et discussion

On peut constater que les cinétiques obtenues avec les quatre types de polymères (MIPs et NIPs) présentent des courbes d'adsorption similaires. La rétention du phosmet augmente rapidement dès les premières heures de mise en contact, elle est maximale après 10 h de contact et constante jusqu'à la fin de l'expérience (24 h). Ce temps de 10 h servira donc de temps optimal de mise en contact pour les études ultérieures.

Les isothermes d'adsorption des quatre polymères (MIPs et NIPs) ont été déterminés dans les conditions appropriées (ratio éthanol/hexane) en présence de concentrations de phosmet comprises entre $5 \cdot 10^{-6}$ M et 10^{-3} M (soit de 2 à 317 mg.L^{-1}). La figure 3.14 représente la capacité d'adsorption du phosmet pour les différents polymères (MIPs et NIPs) en fonction de la concentration obtenue à l'équilibre.

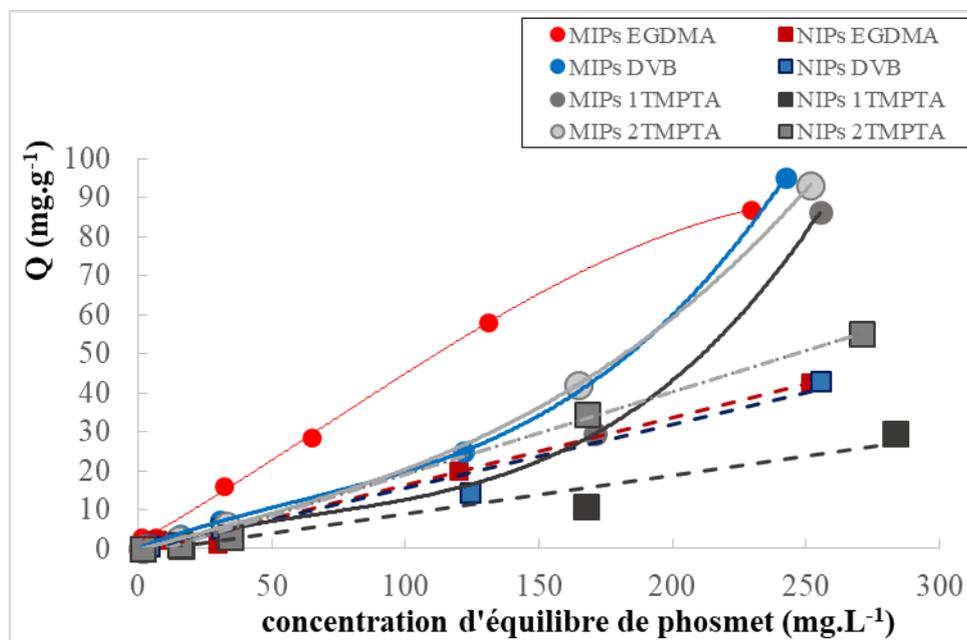


Figure 3.14. Isothermes d'adsorption des différents polymères (MIPs et NIPs) en présence de concentrations croissantes de phosmet.

La comparaison des isothermes d'adsorptions obtenues avec les polymères imprimés (MIPs) et non-imprimés (NIPs) montre une capacité d'adsorption supérieure des MIPs, quel que soit l'agent de réticulation utilisé, mettant en évidence l'effet de l'empreinte moléculaire (Fig. 3.14). On peut noter également que la gamme de concentrations testées n'a pas permis de mettre en évidence un plateau pour les $\text{MIP}_{1\text{TMPTA}}$, $\text{MIP}_{2\text{TMPTA}}$ et MIP_{DVB} . Enfin, l'isotherme d'adsorption obtenue pour le $\text{MIP}_{\text{EGDMA}}$ montre une meilleure adsorption de ce polymère pour des concentrations de phosmet inférieures à 200 mg.L^{-1} ($6,3 \cdot 10^{-4}$ M).

Chapitre 3 : Résultats et discussion

En ce qui concerne les polymères non imprimés, le NIP_{2TMPTA}, basé sur un ratio MBAA/TMTPA de 4:17 semble présenter une adsorption non spécifique supérieure à celles des autres NIPs ; ceci peut être corrélé à la présence d'un plus grand nombre de monomères fonctionnels (MBAA) à la surface de ce NIP. En effet, ce phénomène est moins marqué pour le NIP_{1TMPTA} qui a été fabriqué à partir d'un ratio supérieur en agent de réticulation (ratio MBAA/TMTPA de 4:25). Cette remarque permet de conclure que l'agent réticulant TMPTA utilisé à un ratio molaire 1:4:17 ne suffit pour masquer le monomère fonctionnel responsable d'adsorption non spécifique.

c.4) Modélisation des interactions polymère/phosmet

Plusieurs modèles permettant d'étudier les phénomènes d'adsorption ont été décrits dans la littérature, parmi lesquels certains peuvent être applicables aux isothermes d'adsorption obtenues pour nos quatre polymères. Ces modèles devraient nous permettre d'évaluer le nombre et l'affinité des sites de fixation pour chacun des MIPs et NIPs développés. Les modèles d'adsorption les plus utilisés dans la bibliographie sont les isothermes de Langmuir et de Freundlich. Chaque modèle est basé sur une hypothèse différente.

L'hypothèse de Langmuir est basée sur un phénomène d'adsorption homogène. Tous les sites de fixation sont équivalents, chaque site est occupé par une seule molécule et il n'existe qu'un ou deux types de sites de reconnaissance au sein du polymère. La capacité d'adsorption peut atteindre une valeur maximale appelée Q_{max} .

L'équation de Langmuir après linéarisation est la suivante :

$$\frac{1}{Q} = \frac{1}{Q_{max} K_L C_e} + \frac{1}{Q_{max}}$$

Le tracé de $1/Q$ en fonction de $1/C_e$ donne une relation linéaire de coefficient directeur $1/(Q_{max} K_L)$ et d'ordonnée à l'origine $1/Q_{max}$. Le tableau 3.6 récapitule les coefficients de corrélation et les paramètres (pente et ordonnée à l'origine) obtenues pour chaque polymère (MIPs et NIPs).

Chapitre 3 : Résultats et discussion

Tableau 3.6. Coefficients de corrélation et composantes des régressions linéaires obtenues suivant l'équation de Langmuir, pour chaque polymère étudié.

Polymère	R ²	$\frac{1}{Q_{\max}} K_L$	$\frac{1}{Q_{\max}}$
MIP _{1TMPTA}	0,997	7,6252	0,0236
NIP _{1TMPTA}	0,963	11,557	0,2747
MIP _{2TMPTA}	0.9982	34.984	-0.4883
NIP _{2TMPTA}	0.998	12.516	-0.1617
MIP _{EGDMA}	0,99	3,19	-0,004
NIP _{EGDMA}	0,94	3,84	0,08
MIP _{DVB}	0,99	3,6617	-0,0208
NIP _{DVB}	0,99	6,505	-0,0113

On constate que, quel que soit le polymère testé (MIP ou NIP), les coefficients de corrélation obtenus sont très satisfaisants, avec des valeurs de r^2 comprises entre 0,94 et 0,998. Les valeurs de capacité maximale d'adsorption obtenues sont négatives pour la plupart des MIPs (MIP_{2TMPTA}, MIP_{EGDMA}, MIP_{DVB}), ainsi que pour les NIPs (NIP_{2TMPTA} et NIP_{DVB}), montrant que le modèle n'est pas applicable à ces polymères. Compte-tenu de l'hypothèse de départ sur laquelle repose ce modèle (énergie d'adsorption constante et sites d'adsorption uniformes), on peut en conclure que les polymères précités présentent une structure très hétérogène (Umpleby *et al.*, 2004).

Les constantes d'adsorption de Langmuir K_L , ainsi que la capacité maximale d'adsorption Q_{\max} , ont été calculées pour les polymères MIP_{1TMPTA}, NIP_{1TMPTA}, et NIP_{EGDMA}, les résultats sont présentés dans le tableau 3.7.

Tableau 3.7. Capacité maximale d'adsorption et constantes de Langmuir obtenues pour les polymères appropriés à ce modèle.

	Q_{\max} (mg/g)	K_L (mL/mg)
MIP _{1TMPTA}	42,4	0,0031
NIP _{1TMPTA}	3,6	0,0237
NIP _{EGDMA}	12,5	0,0208

Chapitre 3 : Résultats et discussion

Les résultats obtenus montrent que le MIP_{1TMPTA} a une affinité plus faible que le NIP_{1TMPTA}, comme l'indique la plus grande valeur de la constante de Langmuir obtenue dans le cas du NIP_{1TMPTA}. Cela peut s'expliquer par la présence d'une plus grande quantité de monomères fonctionnels à la surface du NIP qui seraient plus accessibles au phosmet, ce qui augmenterait l'affinité (Henry, 2012). Au vu de sa capacité d'adsorption de 42,4 mg.g⁻¹, bien supérieure à celle du NIP_{1TMPTA} (3,6 mg.g⁻¹), il semble que le MIP_{1TMPTA} comporte de nombreux sites de fixation résultant de l'impression moléculaire. Toutefois ces sites semblent difficilement accessibles pour le phosmet.

En ce qui concerne le NIP_{EGDMA}, ce polymère présente une adsorption compatible avec l'hypothèse de Langmuir, il possède donc des sites d'adsorption uniformes et est très homogène.

Pour vérifier ces conclusions, nous avons confronté les résultats d'absorption obtenus pour chaque polymère avec le modèle de Freundlich. L'hypothèse de Freundlich est basée sur un modèle d'adsorption hétérogène, impliquant plusieurs sites de reconnaissance (sites de haute, moyenne et faible affinité) et dont la capacité d'adsorption n'atteint pas de plateau lorsque C_e augmente.

L'équation de Freundlich obtenue après linéarisation est la suivante :

$$\log Q = \log a + m \cdot \log C_e \quad 3.4$$

Q : capacité d'adsorption (mg.g⁻¹).

C_e : concentration de la molécule cible à l'équilibre (mg.L⁻¹).

a : coefficient d'adsorption de Freundlich (mg^(1-m).g⁻¹.L^m).

m : indice d'hétérogénéité qui varie entre 0 et 1 (lorsque m est proche de 1, la surface du polymère tend à être homogène).

Le tracé de log Q en fonction de log (C_e) conduit à une représentation linéaire de pente m et d'ordonnée à l'origine log a. Le tableau 3.8 récapitule les coefficients de corrélation et les constantes de Freundlich obtenues pour chaque polymère.

Chapitre 3 : Résultats et discussion

Tableau 3.8. Coefficients de corrélation et composantes des régressions linéaires obtenues suivant l'équation de Freundlich, pour chaque polymère étudié.

Polymère	R^2	a	m
MIP _{1TMPTA}	0,98	0,0933	1,1622
NIP _{1TMPTA}	0,94	0,0621	1,0467
MIP _{2TMPTA}	0,99	0,0683	1,2825
NIP _{2TMPTA}	0,99	0,0209	1,416
MIP _{EGDMA}	0,9	1,439	0,698
NIP _{EGDMA}	0,78	0,125	0,978
MIP _{DVB}	0,99	0,328	0,9043
NIP _{DVB}	0,99	0,1695	0,9447

Comme on peut l'observer dans le tableau 3.8 les polymères synthétisés avec l'agent réticulant TMPTA présentent un indice d'hétérogénéité (m) supérieur à 1 (valeurs en rouge), démontrant que le modèle de Freundlich n'est pas applicable à ces polymères.

L'indice d'hétérogénéité des NIP_{EGDMA} et NIP_{DVB} sont proches de 1, ce qui indique une grande homogénéité de ces polymères. Pour ce qui est du NIP_{EGDMA}, ce résultat cela confirme les conclusions déduites de l'interprétation du modèle de Langmuir.

Le MIP_{EGDMA} présente l'adsorption la plus hétérogène, avec un indice m proche de 0,7, très inférieur à celui du NIP correspondant, montrant que ce polymère présente également des sites d'adsorption spécifiques liés au processus d'impression moléculaire. Il en résulte que le coefficient d'adsorption (a) mesuré pour le MIP_{EGDMA} est le plus élevé de tous les polymères testés.

Distribution d'affinité des sites d'adsorption dans le modèle de Freundlich.

Cette expérience a été réalisée afin de comparer les deux polymères (MIP et NIP) synthétisés avec deux agents réticulant différents (EGDMA et DVB), dont les indices d'hétérogénéité (m) sont compris entre 0,7 et 0,94. Ce modèle est applicable pour des concentrations de phosmet faibles, éloignés des concentrations saturantes pour le polymère étudié. Nous avons donc travaillé dans le domaine de sub-saturation, compris entre $5 \cdot 10^{-6}$ et 10^{-3} mol.L⁻¹ (soit de 2 à 317 mg.L⁻¹), facilement identifiable par la linéarité de la forme log-log de l'isotherme de Freundlich.

La constante d'association K_{ass} est liée à la concentration en soluté choisie pour le tracé des isothermes d'adsorption,

$$K_{\text{min}} = \frac{1}{C_{\text{max}}} \quad \text{et} \quad K_{\text{max}} = \frac{1}{C_{\text{min}}} \quad 3.5$$

Chapitre 3 : Résultats et discussion

Pour évaluer le nombre de sites d'adsorption $N_{K_1-K_2}$ et la constante d'association $\overline{K}_{K_1-K_2}$ dans l'intervalle $[K_1 ; K_2]$ situé dans le domaine $[K_{\min} ; K_{\max}]$, on a utilisé les deux équations suivantes :

$$N_{(K_1-K_2)} = a (1-m^2) (K_1^{-m} - K_2^{-m}) \quad 3.6$$

$$\overline{K}_{K_1-K_2} = \frac{m}{m-1} \left(\frac{K_1^{1-m} - K_2^{1-m}}{K_1^{-m} - K_2^{-m}} \right) \quad 3.7$$

Le tracé de $\ln N$ en fonction de $\ln K_{\text{ass}}$ dans un intervalle $[K_1 ; K_2]$ situé dans le domaine de 2 à 317 mg.L⁻¹ conduit à une relation linéaire. L'ordonnée à l'origine du segment de droite obtenu est lié au nombre apparent de sites d'adsorption, alors que la pente montre l'hétérogénéité du polymère (-m) (Rampey *et al.*, 2004). Les résultats de distribution d'affinité pour les MIP et NIP de EGDMA et DVB sont présentés dans la figure 3.15. On peut observer que pour chaque polymère synthétisé avec EGDMA ou DVB, l'ordonnée à l'origine de la droite de distribution d'affinité du MIP est toujours supérieure à celle du NIP, traduisant un nombre apparent de sites d'adsorption supérieur. Cette différence est beaucoup plus marquée pour le MIP synthétisé en utilisant l'EGDMA comme agent réticulant (Fig. 3.15).

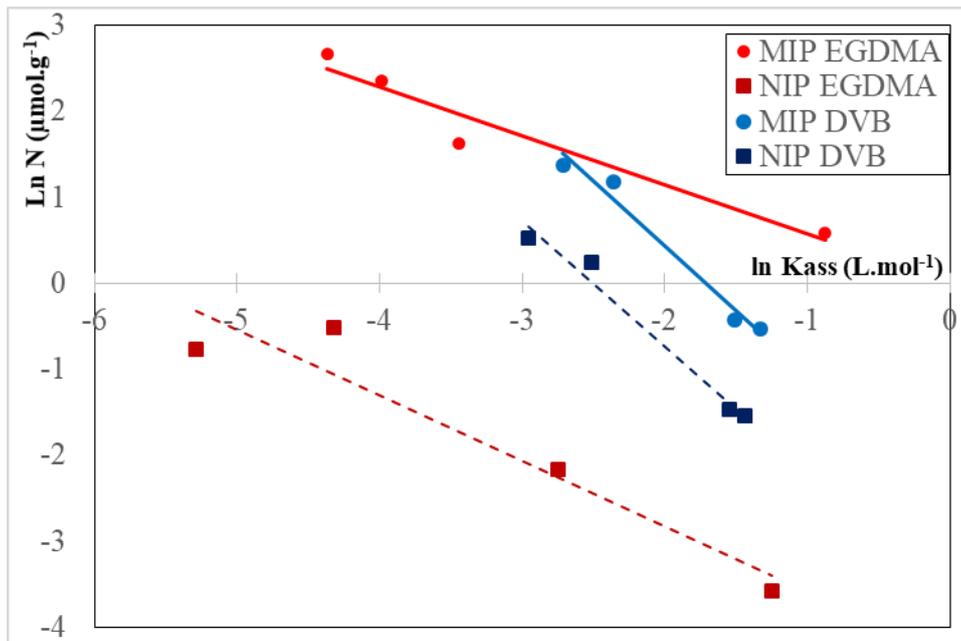


Figure 3.15. Distributions d'affinité déterminées à partir des isothermes de Freundlich pour les MIPs et NIPs synthétisés en utilisant comme agent de réticulation l'EGDMA ou le DVB (gamme de concentration en phosmet comprise entre 2 à 317 mg.L⁻¹).

Chapitre 3 : Résultats et discussion

La forte différence observée entre les droites obtenues pour le MIP et le NIP montre clairement que l'EGDMA favorise l'adsorption spécifique du phosmet (Fig. 3.15). Cet agent de réticulation a donc été utilisé dans la suite du travail.

3.2. Extraction du phosmet sur colonne en utilisant les polymères sélectionnés (MISPE)

Dans cette partie, nous avons optimisé les conditions d'extraction du phosmet sur cartouche par MISPE «Molecularly Imprinted Solid Phase Extraction». La procédure d'extraction par MISPE comporte quatre étapes principales :

- L'étape de conditionnement, qui permet de préparer le polymère au dépôt de l'échantillon.
- Le dépôt, qui est réalisé dans un solvant favorable à la rétention du phosmet par les sites spécifiques du MIP.
- Le lavage, qui permet d'éliminer les molécules de phosmet fixées de manière non spécifique en rompant les interactions non spécifiques à la surface du polymère (MIP ou NIP).
- L'élution, qui permet de libérer les molécules piégées dans les cavités du MIP, elle met en jeu un solvant capable de rompre les liaisons hydrogène existant entre le MBAA contenu dans les cavités et le phosmet.

La capacité de rétention du phosmet a été déterminée pour chaque MIP, puis leur sélectivité a été évaluée en utilisant un autre pesticide appartenant à la famille des organophosphorés.

3.2.1. Choix du solvant de dépôt

En général, le solvant de dépôt est identique à celui utilisé lors de synthèse de MIP (Yoshizako *et al.*, 1998). Toutefois, comme expliqué précédemment, dans l'optique d'extraire le phosmet de la matrice huile, il ne nous est pas possible d'utiliser le solvant de synthèse DMSO dans cette étude.

Nous avons donc dans un premier temps déterminé le solvant de dépôt le plus adapté à la rétention du phosmet par les sites spécifiques du MIP, les 4 solvants testés ont été l'hexane, le dichlorométhane, le chloroforme et l'éthanol. Ces solvants présentent l'avantage d'être

Chapitre 3 : Résultats et discussion

miscibles avec l'huile d'olive, leurs polarités et leurs capacités à recevoir ou à donner des liaisons hydrogène sont résumées dans le tableau 3.9.

Tableau 3.9. Propriétés physico-chimiques des solvants et produits utilisés lors des étapes de synthèse et d'extraction du phosmet (données PubChem).

Nom	Constante di-électrique	Solubilité du phosmet	Log K_{ow}	Nombre de receveurs de liaisons H	Nombre de donneurs de liaisons H
Hexane	1,9	$\geq 1 \text{ g.L}^{-1}$	3,9	0	0
Phosmet	-	-	2,95	6	0
Chloroforme	4,8	$> 1000 \text{ g.L}^{-1}$	1,97	0	0
Dichlorométhane	9,1	100 g.L^{-1}	1,25	0	0
Acétate d'éthyle	6,02	$\geq 1 \text{ g.L}^{-1}$	0,73	2	0
Ethanol	16,2	$< 10 \text{ g.L}^{-1}$	-0,31	1	1
DMSO	47	nd	-1,35	2	0
MBAA	-	-	0,1	2	2

Les essais de rétention ont été réalisés en utilisant des colonnes d'extraction en phase solide en verre contenant 100 mg de polymère (MIP ou NIP). 1 mL de solution de phosmet préparée à 10^{-6} M dans les différents solvants testés ont été percolés au travers de la colonne et le percolat recueilli a été analysé. La figure 3.16 présente les taux de phosmet obtenus dans le percolat de dépôt en fonction du solvant de dépôt utilisé.

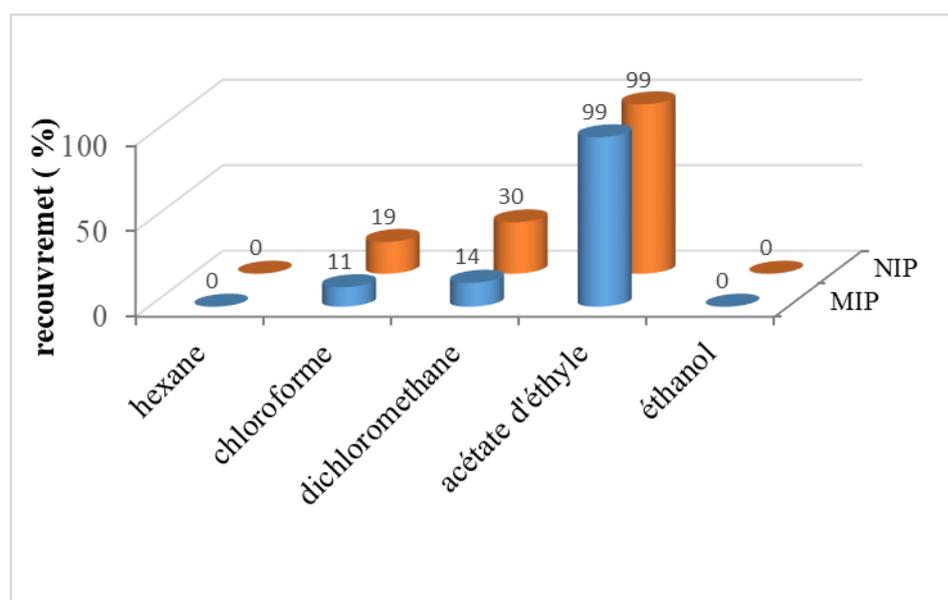


Figure 3.16. Pourcentage de phosmet récupéré dans le percolat issu du solvant de dépôt du phosmet sur les MIP et NIP, en fonction de la nature du solvant utilisé.

Chapitre 3 : Résultats et discussion

Plusieurs remarques peuvent être tirées de ces résultats :

- On constate tout d'abord qu'il n'y a aucune rétention du phosmet sur les polymères lorsque celui-ci est dilué dans l'acétate d'éthyle. En effet le phosmet est très soluble dans ce solvant et est fortement entraîné par celui-ci. De plus, l'acétate d'éthyle peut échanger des liaisons hydrogène avec le polymère, empêchant le phosmet de se fixer sur ce dernier.
- L'utilisation de chloroforme et de dichlorométhane n'a pas permis une rétention très satisfaisante du phosmet, mais des différences de rétention entre MIP et NIP de 7,2% et 16% ont été respectivement observées, ce qui démontre la présence au sein du MIP de sites de reconnaissance spécifiques du phosmet. Pour ces deux solvants, une diminution de la rétention est observée lorsque la polarité du solvant augmente, ce qui est en accord avec les résultats obtenus lors de l'étude d'adsorption en batch.
- Seuls l'hexane et l'éthanol ont permis une rétention totale du phosmet dans les polymères, malgré leurs caractéristiques physico-chimiques très différentes. Cependant, on n'observe aucune différence entre MIPs et NIPs, suggérant que des interactions non spécifiques sont majoritairement responsables de cette rétention. Dans l'optique d'extraire le phosmet de la matrice huile d'olive, nous avons sélectionné dans une première approche l'hexane comme solvant de dépôt, celui-ci étant parfaitement miscible à l'huile.

3.2.2. Choix du solvant de lavage

Comme décrit dans la section précédente, des colonnes contenant 100 mg de MIP et NIP ont été chargées avec 1 mL de phosmet à 10^{-6} M dans l'hexane. Après passage du solvant de dépôt, la colonne a été lavée en utilisant 1 mL de solvant de lavage et le percolat obtenu a été analysé. La figure 3.17 présente les taux de phosmet obtenus dans le percolat de lavage en fonction du solvant de lavage utilisé.

Chapitre 3 : Résultats et discussion

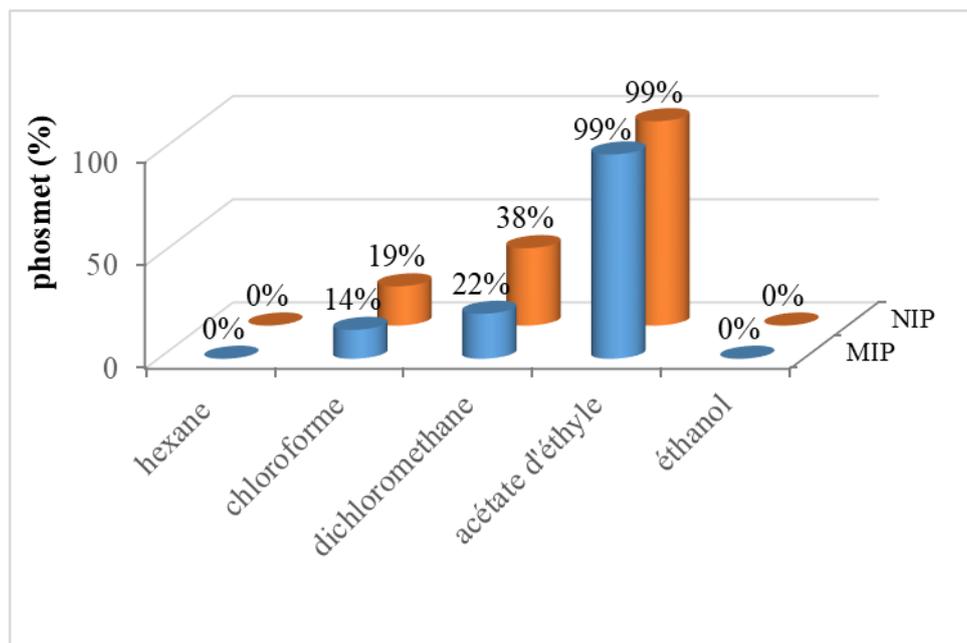


Figure 3.17. Pourcentage de phosmet récupéré dans le percolat issu du lavage des MIP et NIP, en fonction du solvant utilisé.

Les résultats observés sont en accord avec ceux obtenus lors de l'étude de choix du solvant de dépôt :

- L'utilisation d'hexane et d'éthanol ne permet pas d'éliminer le phosmet adsorbé de manière non spécifique, que ce soit sur le MIP ou sur le NIP.
- A l'inverse, l'utilisation d'acétate d'éthyle permet d'éliminer l'intégralité du phosmet, qu'il soit adsorbé de manière spécifique ou non spécifique (MIP ou NIP). Ce solvant semble donc le plus adapté pour l'étape d'éluion, il sera utilisé par la suite à ces fins.
- L'utilisation de chloroforme et de dichlorométhane semble permettre d'éliminer une partie du phosmet fixé sur les MIP de manière non spécifique (respectivement 14% et 21,8%). Toutefois, le chloroforme et le dichlorométhane ne sont pas très efficaces pour éliminer totalement l'adsorption non spécifique, puisque 81% et 62% de phosmet restent respectivement fixés sur le polymère non imprimé (NIP).

Après éluion avec 3 mL d'acétate d'éthyle, la quantité de phosmet éluee a été analysée et le facteur d'empreinte (IF) des polymères a été calculé dans chaque cas à partir des rendements d'éluions obtenus sur MIP et sur NIP :

$$\text{IF} = \text{Rendement d'éluion sur MIP} / \text{Rendement d'éluion sur NIP}$$

Les résultats présentés dans le tableau 3.10 montrent que les meilleurs facteurs d'empreinte sont obtenus lorsque le chloroforme et le dichlorométhane sont utilisés pour le lavage de la

Chapitre 3 : Résultats et discussion

colonne. Toutefois, les facteurs d'impression obtenus sont relativement faibles, de l'ordre de 1,2, montrant qu'il existe peu de différence d'adsorption entre MIP et NIP.

Tableau 3.10. Facteurs d'empreinte (IF) obtenus en fonction du solvant utilisé.

Solvant du lavage	Hexane	Chloroforme	Dichlorométhane	Acétate d'éthyle	Ethanol
IF	1	1,2	1,2	0	1,1

Afin d'éliminer de manière plus efficace le phosmet adsorbé sur NIP, nous avons doublé le volume de solvant de lavage à 2 mL. Les résultats présentés dans la figure 3.18 montrent que dans ces conditions le chloroforme et le dichlorométhane permettent une élution totale du phosmet sur MIP et sur NIP. Seule l'utilisation d'éthanol permet d'obtenir un lavage plus efficace du phosmet adsorbé sur le NIP (14%).

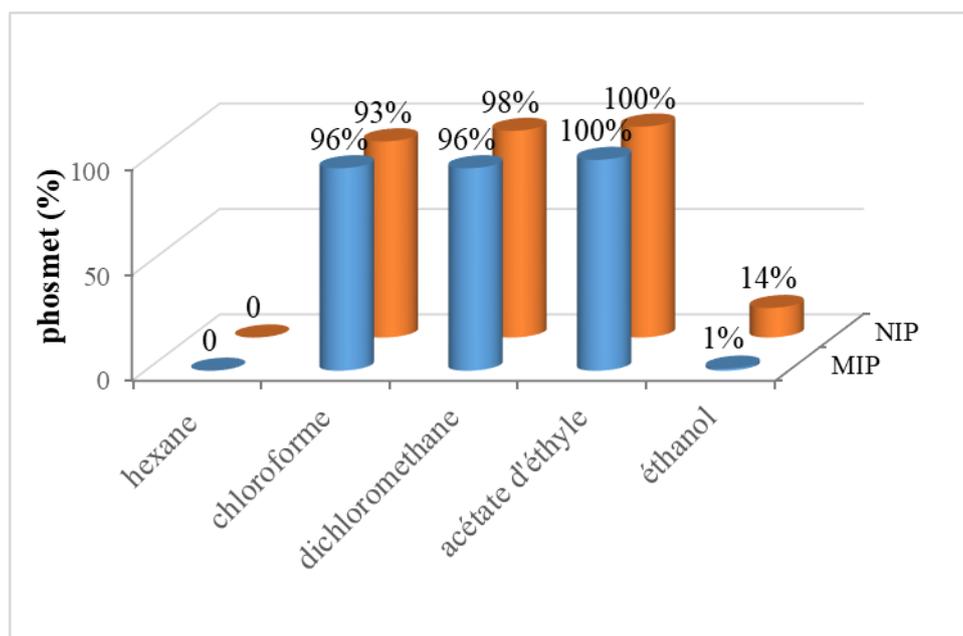


Figure 3.18. Pourcentage de phosmet récupéré dans le percolat après lavage des MIP et NIP avec 2 mL de solvant, en fonction du solvant utilisé.

En se basant sur ce résultat, nous avons réalisé 3 extractions successives du phosmet à 10^{-6} M préparé dans l'hexane en utilisant 2 mL d'éthanol comme solvant de lavage. Le protocole d'extraction est présenté dans le tableau 3.11.

Chapitre 3 : Résultats et discussion

Tableau 3.11. Protocole d'extraction en phase solide appliqué aux MIP et NIP (protocole 1).

Etape	Solvants	Volume (mL)
Nettoyage et Conditionnement	Acétate d'éthyle	6
	Ethanol	6
	Hexane	6
Dépôt	Phosmet 10^{-6} M dans l'hexane	1
Lavage	Ethanol	2
Elution	Acétate d'éthyle	3

- L'étape de nettoyage et de conditionnement implique l'utilisation de 3 solvants. L'acétate d'éthyle permet d'éliminer les molécules résiduelles et autres contaminants. L'éthanol permet d'activer le polymère par établissement de liaisons hydrogènes. L'hexane permet le pré-conditionnement de la colonne avant dépôt de la solution de phosmet préparée dans ce même solvant.

- L'étape de dépôt est réalisée dans l'hexane, ce solvant permet d'éliminer des molécules apolaires à la surface du polymère. Il favorise la rétention totale du phosmet sur MIP et sur NIP.

- L'étape de lavage par l'éthanol (2 mL) permet d'éliminer les interactions non spécifiques du phosmet à la surface du polymère, et d'éluer des molécules polaires potentiellement présentes dans la matrice de l'huile d'olive.

- L'étape d'élution par l'acétate d'éthyle (3 mL) permet de rompre les liaisons hydrogène entre le phosmet et le polymère (MIP ou NIP).

L'efficacité de chaque étape a été évaluée en dosant le phosmet présent dans les percolats correspondants. Les résultats présentés dans la figure 3.19 montrent la bonne efficacité du protocole 1 pour l'extraction sur MIP, puisque près de 100 % du phosmet (95%) sont récupérés à l'issue de l'étape d'élution. Malgré cela, on peut observer qu'une fraction non négligeable de phosmet est éliminée dès l'étape de lavage. Le facteur d'empreinte calculé est proche de 2 (1,96), il est nettement supérieur à celui observé en utilisant les solvants chlorés comme solvants de lavage. On peut constater que les résultats obtenus au niveau du NIP ne sont pas très satisfaisants au niveau de leur efficacité et de leur reproductibilité, puisque l'étape de lavage ne permet d'éliminer que $25\pm 10\%$ du phosmet, alors que l'étape d'élution conduit à récupérer $50\pm 25\%$ de phosmet (Fig. 3.19).

Chapitre 3 : Résultats et discussion

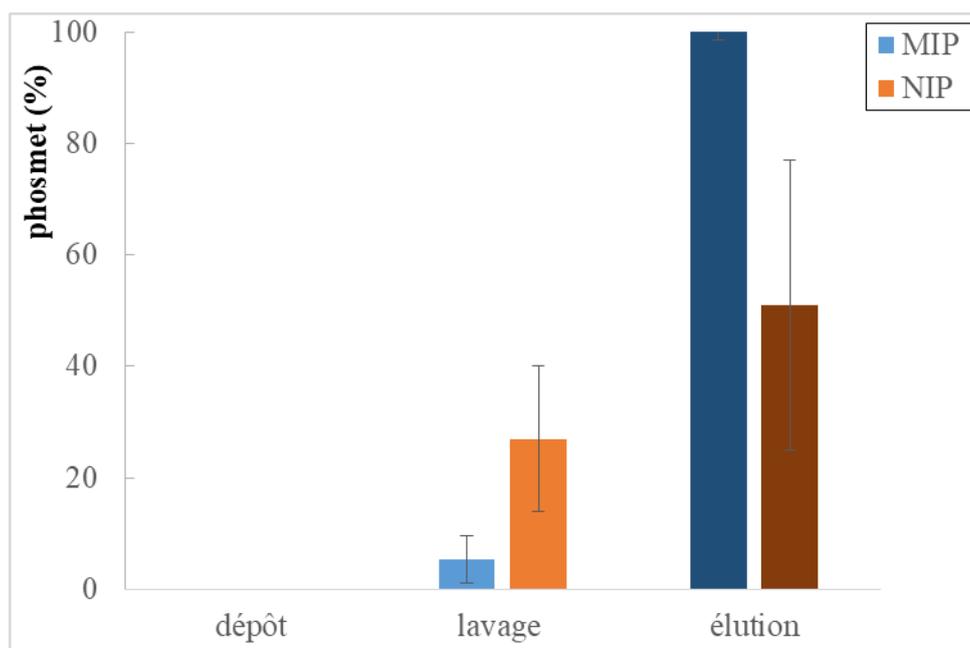


Figure 3.19. Pourcentage de phosmet récupéré dans les percolâts de dépôt, de lavage et d'élution des MIP et NIP en utilisant le protocole d'extraction 1 décrit dans le tableau 3.11 (n=3).

En se basant sur ces résultats, et dans le but d'obtenir un rendement d'extraction sur NIP de 100%, nous avons envisagé un deuxième protocole impliquant une étape de lavage avec 3 mL d'éthanol (au lieu de 2 mL), le protocole 2 est décrit dans le tableau 3.12.

Tableau 3.12. Protocole d'extraction en phase solide appliqué aux MIP et NIP (protocole 2).

Étape	Solvants	Volume (mL)
Conditionnement	Acétate d'éthyle	6
	Ethanol	6
	Hexane	6
Dépôt	Phosmet 10^{-6} M dans hexane	1
Lavage	Ethanol	3
Elution	Acétate d'éthyle	3

Les résultats obtenus après 3 extractions menées suivant le protocole 2 sont présentés sur la figure 3.20. On observe que le rendement global de l'extraction est proche de 100%, que ce soit sur NIP ou sur MIP. Cependant, l'utilisation de 3 mL d'éthanol lors du lavage conduit à un décrochage de près de 45% de phosmet sur le MIP, réduisant par la même la sélectivité de celui-ci. En conséquence le facteur d'impression chute à une valeur de 1,55, contre 1,96 en utilisant le protocole 1.

Chapitre 3 : Résultats et discussion

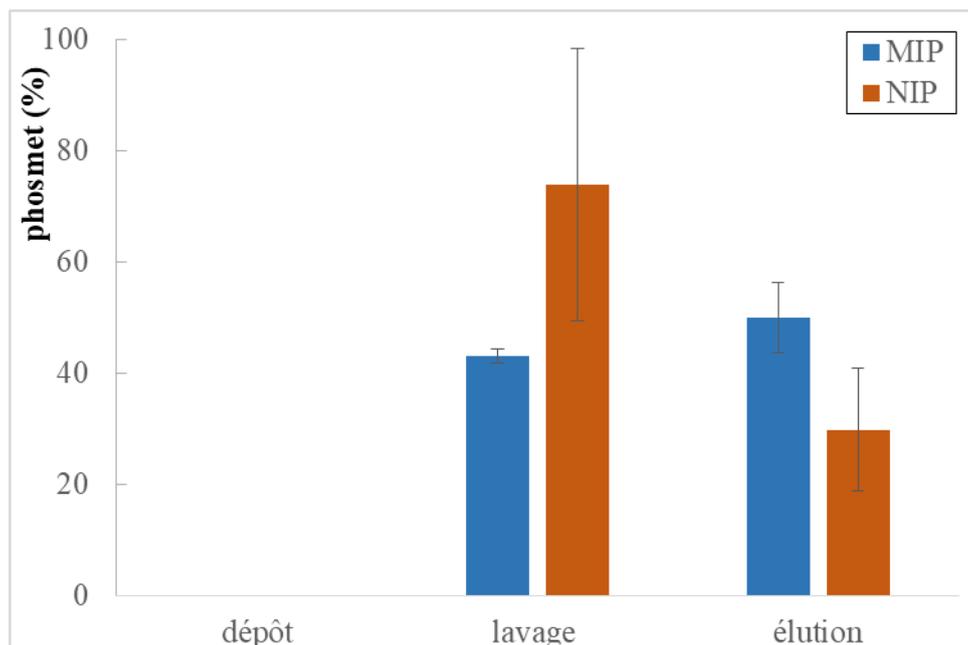


Figure 3.20. Pourcentage de phosmet récupéré dans les percolâts de dépôt, de lavage et d'élution des MIP et NIP en utilisant le protocole d'extraction 2 décrit dans le tableau 3.12 (n=3).

Dans un troisième temps, nous avons envisagé d'utiliser comme solvant de lavage un mélange éthanol/hexane, l'hexane étant le solvant sélectionné pour l'étape de dépôt. Nous avons donc étudié l'effet de 3 mL de mélange éthanol/hexane à différents ratios volumiques sur l'efficacité du lavage des MIP et NIP. Les résultats présentés dans la figure 3.21 montrent que le décrochage du phosmet lors de l'étape de lavage peut être minimisé en diminuant le pourcentage d'éthanol. Des taux de recouvrements proches de 100% sont alors obtenus lors de l'élution.

Chapitre 3 : Résultats et discussion

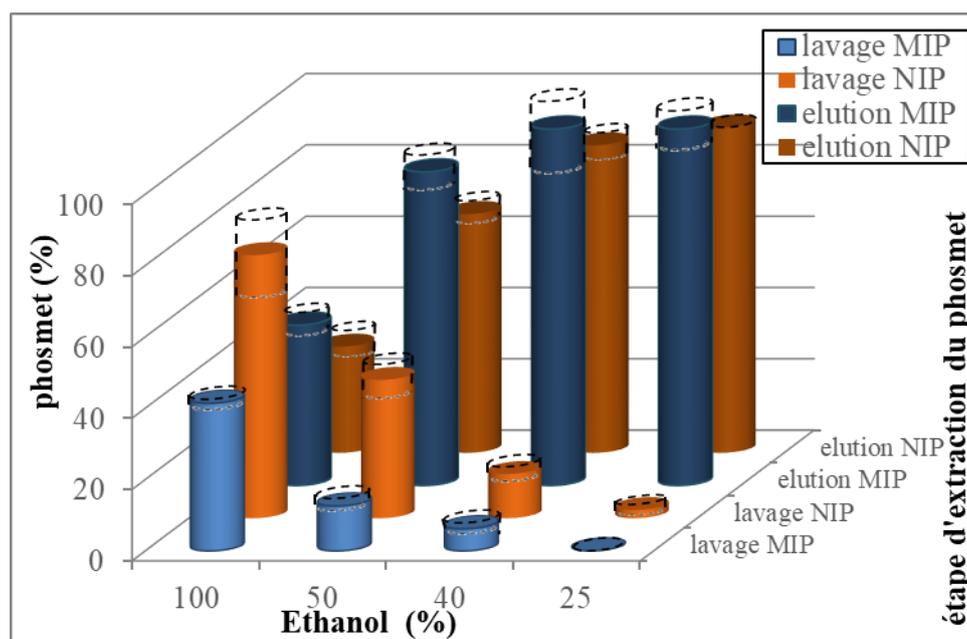


Figure 3.21. Influence de la composition du solvant de lavage (éthanol/hexane) sur la quantité de phosmet (%) récupéré dans les percolâts de lavage et d'éluion des MIP et NIP (volume de lavage 3mL, n=3).

Les facteurs d'empreintes (IF) du MIP ont été calculés à l'issue de l'extraction impliquant les différents solvants de lavage. Les résultats présentés dans le tableau 3.13 montrent que l'utilisation de 25% d'éthanol conduit à un IF=1, signifiant qu'il n'y a aucune différence entre MIP et NIP, et que par conséquent l'adsorption est due à des interactions non spécifiques. L'augmentation du pourcentage d'éthanol jusqu'à 50% se traduit par une augmentation satisfaisante de IF, jusqu'à 1,31, sans perte de rendement global. Il semble donc que l'éthanol contribue à éliminer les interactions non spécifiques.

Tableau 3.13. Facteurs d'empreinte (IF) obtenus en fonction de la composition du solvant de lavage (pourcentage d'éthanol dans le mélange éthanol/hexane).

Ethanol (% vol.)	100%	50%	40%	25%
IF	1,55	1,31	1,16	1,09

L'utilisation lors du lavage d'un volume de 3 mL de mélange éthanol/hexane au ratio volumique 50:50 contribue donc à améliorer la performance des MIPs, sans trop affecter le rendement de l'étape d'éluion (88±10%, n=3)

Chapitre 3 : Résultats et discussion

3.2.3. Optimisation du solvant de dépôt

L'hexane a été choisi comme solvant de dépôt (section 3.2.1) dans le but d'extraire le phosmet de l'huile d'olive. Afin d'augmenter la sensibilité de la méthode d'extraction, nous avons pensé qu'il était plus judicieux de travailler sur un volume de dépôt plus important. Nous avons donc opté pour un dépôt de 10 mL de phosmet à 10^{-7} M (au lieu de 1 mL à 10^{-6} M) afin d'augmenter la capacité de la méthode d'extraction. De plus, à la vue des résultats décrits dans la section précédente et ceux obtenus en utilisant l'éthanol comme unique solvant de dépôt (section 3.2.1), nous avons envisagé l'utilisation d'un mélange éthanol/hexane comme solvant de dépôt. Nous avons donc comparé la rétention du phosmet déposé dans 10 mL d'hexane contenant de 0 à 25% d'éthanol. Les résultats sont présentés dans la figure 3.22.

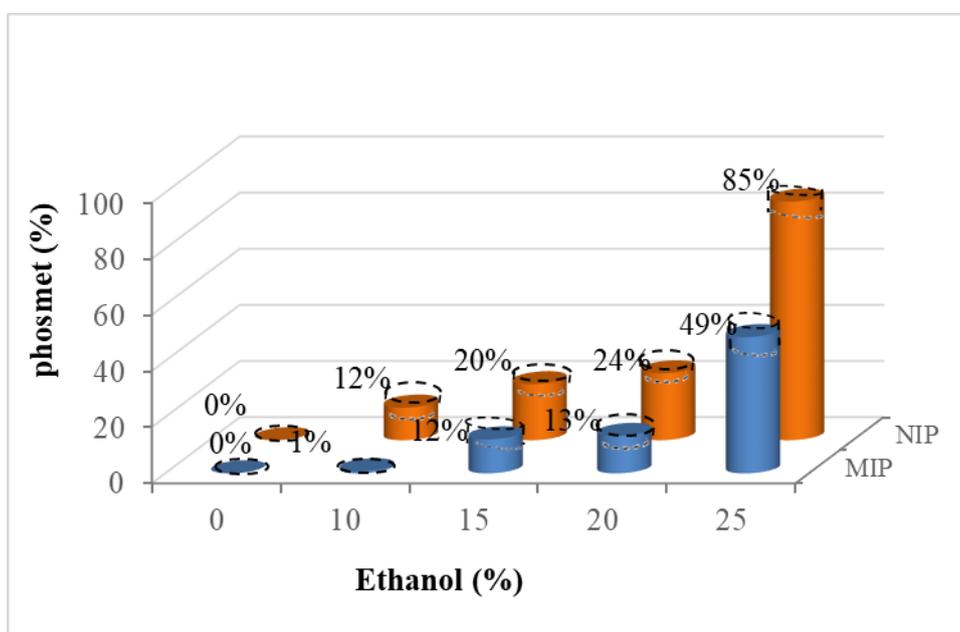


Figure 3.22. Pourcentage de phosmet récupéré dans le percolât de dépôt en fonction de la composition du solvant de dépôt (pourcentage d'éthanol contenu dans le mélange hexane/éthanol) (n=3).

On peut observer dans la figure 3.22 que l'augmentation du pourcentage d'éthanol dans l'hexane se traduit par une plus grande différence d'adsorption entre MIP et NIP. Ainsi, l'utilisation de 25% d'éthanol conduit à une différence d'adsorption de 36% entre MIP (49%) et NIP (85%). Cela confirme que le MIP contient des cavités sélectives du phosmet. Toutefois, il faut noter que l'utilisation d'un tel pourcentage d'éthanol se traduit par une perte de près de 50% de phosmet lors de l'étape de dépôt.

En revanche, l'utilisation de 10% d'éthanol conduit à une rétention quasi totale du phosmet au niveau du MIP, alors que le NIP correspondant n'en retient que 88%. Nous utiliserons donc

Chapitre 3 : Résultats et discussion

par la suite comme solvant de dépôt 10 mL d'un mélange hexane/éthanol au ratio volumique 90:10.

3.2.4. Optimisation du solvant de lavage

Comme décrit dans la section précédente, nous avons réalisé des extractions en utilisant 10 mL de solvant de dépôt constitué d'un mélange hexane/éthanol (90:10). Dans ces conditions, nous avons testé l'influence du pourcentage d'éthanol dans le solvant de lavage (éthanol/hexane). Le protocole d'extraction 3 utilisé est décrit dans le tableau 3.14.

Tableau 3.14. Protocole d'extraction en phase solide appliqué aux MIP et NIP (protocole 3).

Étape	Solvants	Volume (mL)
Conditionnement	Acétate d'éthyle	6
	Ethanol	6
	Hexane	6
Dépôt	Phosmet 10^{-7} M dans hexane/éthanol (90:10)	10
Lavage	Ethanol/hexane	3
Elution	Acétate d'éthyle	3

En se basant sur les résultats observés dans la figure 3.21, nous avons testé dans cette étude des solvants de lavage contenant des ratios d'éthanol inférieurs à 50%. Les taux de phosmet récupérés dans chaque cas lors des étapes de lavage et d'élution sont présentés dans la figure 3.23.

Chapitre 3 : Résultats et discussion

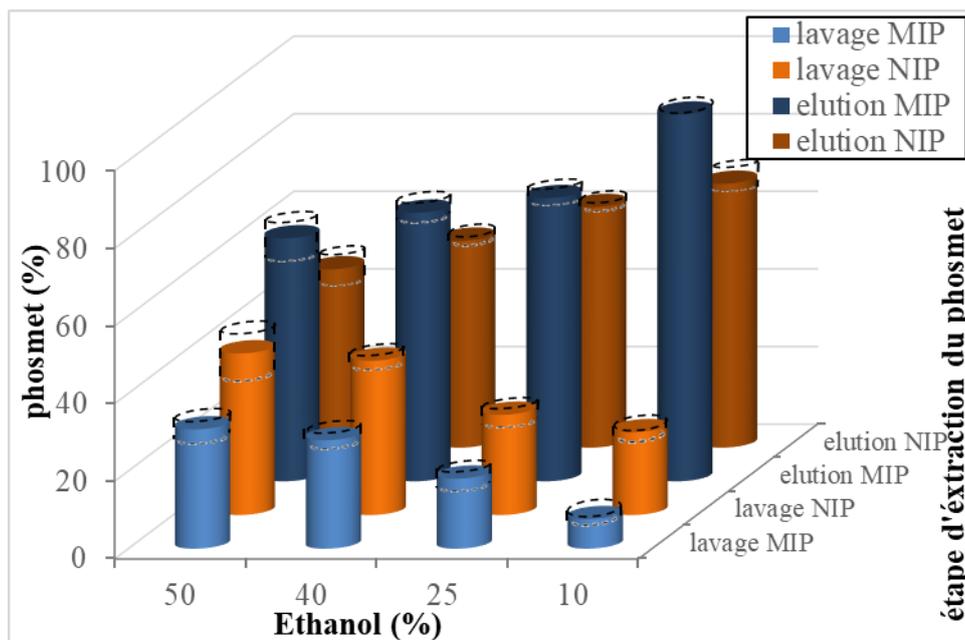


Figure 3.23. Influence de la composition du solvant de lavage (éthanol/hexane) sur la quantité de phosmet (%) récupérée dans les percolâts de lavage et d'éluion des MIP et NIP (suivant le protocole 3, n=3).

Les résultats obtenus sont globalement en accord avec ceux présentés dans la figure 3.22. En effet, on constate que la diminution du ratio d'éthanol permet de réduire les pertes de phosmet lors de l'étape de lavage. Ainsi, l'utilisation de 10% d'éthanol conduit à un rendement de $94,5\% \pm 0,5\%$ lors de l'éluion. Ce pourcentage d'éthanol semble donc permettre d'éliminer les interactions non spécifiques avec les polymères (NIP et MIP), sans affecter les interactions spécifiques avec le MIP. Les facteurs d'empreintes (IF) du MIP ont été calculés à l'issue de l'extraction impliquant les différents solvants de lavage. Les résultats présentés dans le tableau 3.15 montrent que les facteurs d'empreinte calculés varient assez peu quelle que soit la composition du solvant de lavage. De plus ils n'apportent que peu d'information sur la qualité réelle de l'extraction puisqu'ils ne permettent de comparer que les capacités de rétention des MIP et NIP.

Tableau 3.15. Facteurs d'empreinte (IF) obtenus suivant le protocole 3 en fonction de la composition du solvant de lavage (pourcentage d'éthanol dans le mélange éthanol/hexane).

Ethanol (% vol.)	50%	40%	25%	10%
IF	1,36	1,3	1,18	1,39

Chapitre 3 : Résultats et discussion

En conclusion de cette étude, nous utiliserons donc par la suite comme solvant de dépôt 10 mL d'un mélange hexane/éthanol au ratio volumique 90:10 et comme solvant de lavage 3 mL du même mélange (Tableau 3.16). Ce choix est en accord avec plusieurs études qui préconisent l'utilisation du même solvant pour le dépôt et le lavage (Yilmaz & Basan, 2015 ; Yoshizako *et al.*, 1998 ; Pichon, 2007).

Tableau 3.16. Protocole d'extraction en phase solide appliqué aux MIP et NIP (protocole 4).

Etape	Solvants	Volume (mL)
Conditionnement	Acétate d'éthyle	6
	Ethanol	6
	Hexane	6
Dépôt	Phosmet 10^{-7} M dans hexane/éthanol (90 :10)	10
Lavage	Hexane /éthanol (90:10)	3
Elution	Acétate d'éthyle	3

3.2.5. Etude des performances des cartouches MISPE développées

Le but de cette étude d'estimer la capacité des cartouches d'extraction développées. Pour cela, différentes solutions de phosmet ont été préparées dans l'hexane/éthanol (90:10) à des concentrations comprises entre $7,4 \cdot 10^{-8}$ M à $3,4 \cdot 10^{-6}$ M et traitées en utilisant le protocole 4.

La figure 3.24 présente les pourcentages de phosmet récupérés à l'issue de l'élution (taux de recouvrement) pour les NIP et MIP.

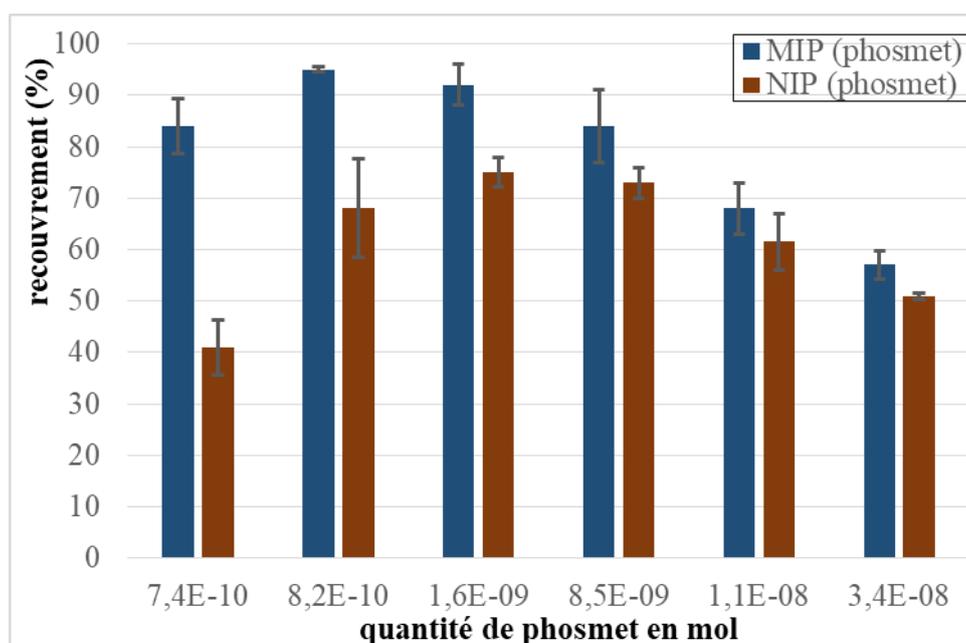


Figure 3.24. Taux de recouvrement obtenus après extraction du phosmet sur MIP (bleu) et NIP (rouge) suivant le protocole 4, en fonction de la quantité de phosmet déposée (en mol) (n=3).

Chapitre 3 : Résultats et discussion

Les résultats obtenus montrent que le taux de recouvrement du phosmet est supérieur à $80\pm 10\%$ pour les concentrations comprises entre $7,4 \cdot 10^{-8}$ M à $8,5 \cdot 10^{-7}$ M (23,5 à 270 ppb). Au-delà de cette concentration une diminution du rendement d'extraction est observée, probablement en raison de la saturation du polymère.

Les facteurs d'empreinte IF ont été calculés afin de comparer l'efficacité des MIP et NIP à pour concentration de phosmet testée (tableau 3.17).

Tableau 3.17. Facteurs d'empreinte (IF) obtenus suivant le protocole 4 en fonction de la quantité de phosmet déposée (en mol) (concentrations comprises entre $7,4 \cdot 10^{-8}$ M et $3,4 \cdot 10^{-6}$ M).

Quantité de phosmet (mol)	$7,4 \cdot 10^{-10}$	$8,2 \cdot 10^{-10}$	$1,6 \cdot 10^{-9}$	$8,5 \cdot 10^{-9}$	$1,1 \cdot 10^{-8}$	$3,4 \cdot 10^{-8}$
IF	2,05	1,4	1,23	1,15	1,11	1,12

Ce tableau montre que l'IF diminue progressivement lorsque la concentration de phosmet augmente, puis se stabilise à une valeur proche de 1. Cela conduit à conclure qu'à faible concentration en phosmet ($7,4 \cdot 10^{-10}$ M) les sites de hautes affinités présentes au niveau des MIPs sont rapidement saturés par le phosmet. Lorsque la concentration de phosmet augmente, celui-ci se fixe sur des sites de reconnaissance non spécifiques qui sont également présents sur le NIP, ceci se traduit par une diminution de l'IF.

3.2.6. Etude de la sélectivité de la méthode d'extraction développée

Nous avons testé la sélectivité de la méthode d'extraction basée sur le protocole 4 en utilisant comme potentiel composé interférant le diméthoate (figure 3.25). Il s'agit d'un autre insecticide organophosphoré couramment utilisé dans le traitement contre la mouche de l'olivier, et donc potentiellement présent dans l'huile d'olive.

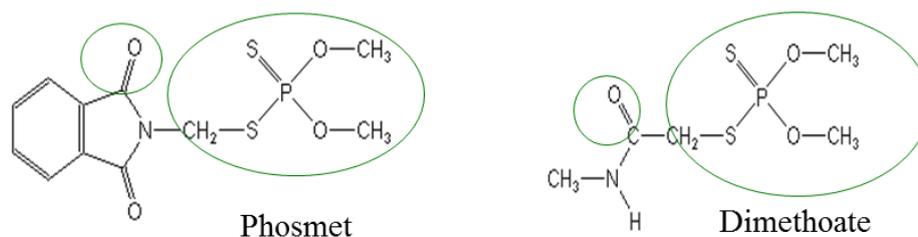


Figure 3.25. Structures chimiques du phosmet et du diméthoate.

Chapitre 3 : Résultats et discussion

Le phosmet et le diméthoate diffèrent par la nature du groupement partant lié au groupement diméthylphosphorodithioate (entouré en vert). Chez le diméthoate, ce groupement est un N-méthylacétamide, alors que chez le phosmet il s'agit d'un N-méthylphthalimide, stériquement plus encombrant. Le phosmet présente six sites accepteurs de liaison H alors que le diméthoate en compte cinq, ainsi qu'un site de donneur de liaison H.

Nous avons testé dans un premier temps la rétention du diméthoate selon le protocole 4, en utilisant des concentrations de $4,8 \cdot 10^{-7}$ M à $2,6 \cdot 10^{-6}$ M, comparables à celles utilisées pour le phosmet. La figure 3.26 présente le taux de recouvrement du diméthoate à l'issue de l'étape d'éluion. Les résultats montrent que le taux de recouvrement de diméthoate est compris entre 30% et 40%, et qu'aucune différence de rétention n'est observée entre MIP et NIP ($0,92 < IF < 1,02$).

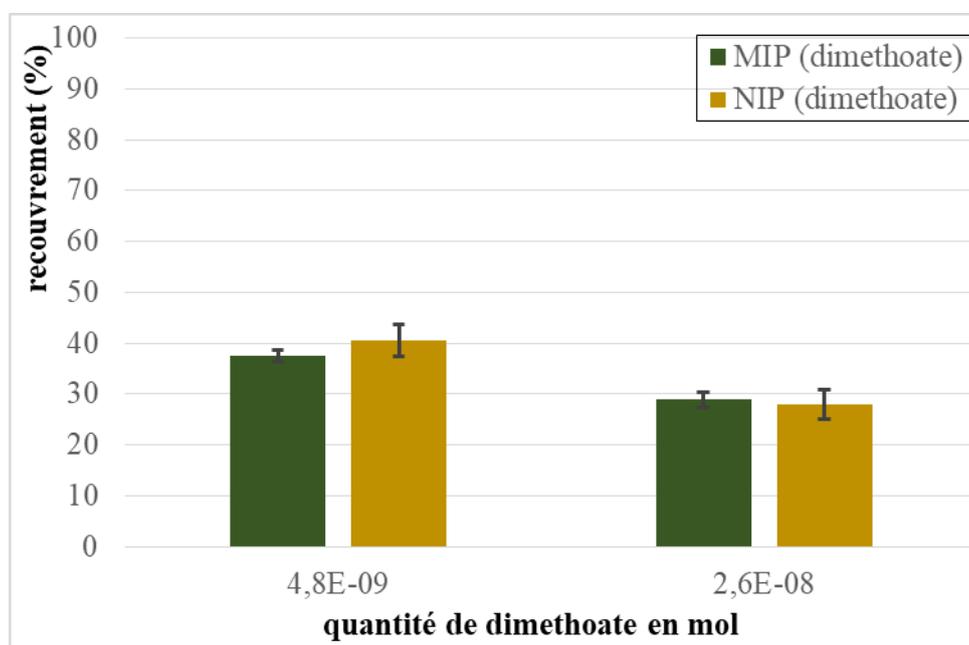


Figure 3.26. Taux de recouvrement obtenus lors de l'extraction du diméthoate sur MIP et NIP en utilisant le protocole 4 (dépôt de 10mL de diméthoate à $4,8 \cdot 10^{-7}$ M à $2,6 \cdot 10^{-6}$ M) (n=3).

Un mélange de diméthoate et de phosmet préparé dans le mélange hexane/éthanol (90:10) à deux concentrations différentes a été ensuite déposé et extrait suivant le même protocole. La figure 3.27 présente les taux de recouvrement obtenus pour les deux pesticides. On observe que près de 80% du phosmet déposé est récupéré à l'issue de l'éluion sur MIP, alors que le taux de recouvrement de diméthoate est compris entre 20 et 30%. Comme observé précédemment on peut constater que la rétention du diméthoate est la même sur MIP et NIP.

Chapitre 3 : Résultats et discussion

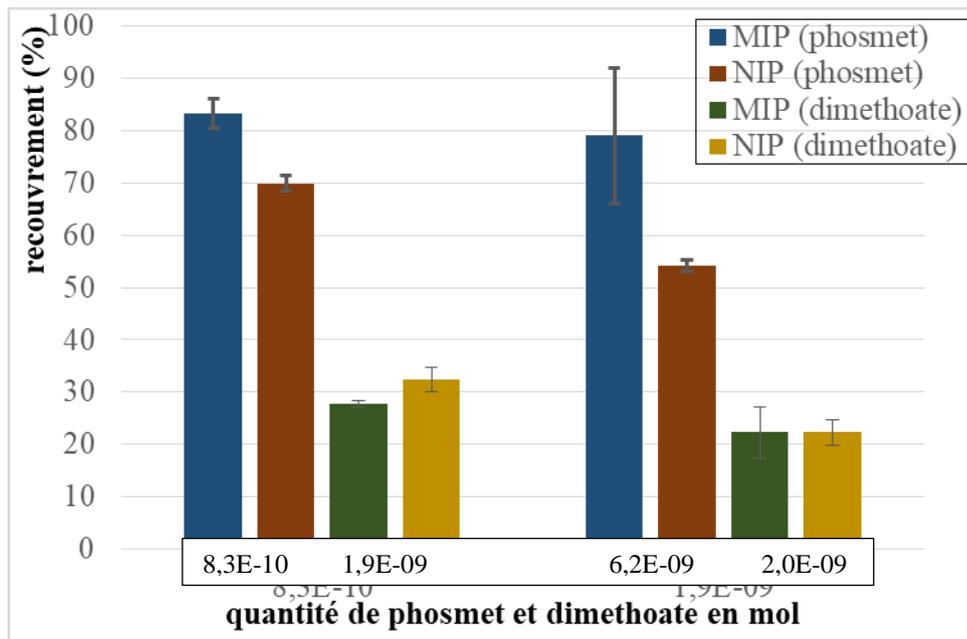


Figure 3.27. Taux de recouvrement obtenus lors de l'extraction d'un mélange du phosmet et diméthoate sur MIP et NIP selon le protocole 4 (dépôt de 10 mL de phosmet ($8,3 \cdot 10^{-8}$ M, $6,2 \cdot 10^{-7}$ M) et de diméthoate ($1,9 \cdot 10^{-7}$ M, $2 \cdot 10^{-7}$ M)) (n=3).

Le tableau 3.18 présente les coefficients de sélectivité K et de sélectivité relative K' obtenus pour les deux extractions, ces coefficients étant déterminés comme suit :

$$K = \frac{\% \text{ rendement d'extraction de phosmet}}{\% \text{ rendement d'extraction de diméthoate}}$$

$$K' = \frac{K_{\text{MIP}}}{K_{\text{NIP}}}$$

Tableau 3.18. Coefficients de sélectivité (K) et de sélectivité relative (K') obtenus pour lors de l'extraction des 2 mélanges de phosmet et de diméthoate.

	Phosmet (M)	Diméthoate (M)	K		K' = $K_{\text{MIP}}/K_{\text{NIP}}$
			K_{MIP}	K_{NIP}	
Mélange 1	$8,3 \cdot 10^{-8}$	$1,9 \cdot 10^{-7}$	3,00	2,15	1,4
Mélange 2	$6,2 \cdot 10^{-7}$	$2,0 \cdot 10^{-7}$	3,55	2,42	1,46

Chapitre 3 : Résultats et discussion

Les résultats dans le tableau 3.18 montrent que les coefficients de sélectivité (K) pour les deux mélanges sont supérieurs à 3 pour le MIP et supérieurs à 2 pour le NIP. Cela montre que la méthode d'extraction optimisée permet d'extraire plus sélectivement le phosmet, que ce soit sur MIP ou sur NIP. D'autre part les coefficients de sélectivité relative obtenus sont de l'ordre de 1,4 à 1,5, montrant que les MIPs présentent une meilleure affinité pour le phosmet en raison de l'effet d'empreinte.

3.3. Extraction du phosmet de l'huile d'olive par MISPE

Afin d'automatiser l'extraction du phosmet, nous avons réalisé l'extraction en utilisant un dispositif en flux inverse (ascendant). Ce dispositif, alimenté par une pompe à seringue, permet au solvant de circuler du bas vers le haut afin d'éviter la création de passages préférentiels dans le phase stationnaire (Jury & Flühler, 1992 ; Limousin *et al.*, 2007). Nous avons ensuite appliqué ce système à l'extraction du phosmet d'huile d'olive.

3.3.1. Optimisation du protocole d'extraction en flux inverse

Nous avons appliqué dans un premier temps le protocole 4 mais les résultats obtenus sur MIP et NIP ont montré des rendements d'extraction de phosmet très faibles. Nous avons donc dans un deuxième temps préparé le phosmet dans l'hexane, et gardé les solvants de lavage et d'éluion utilisés dans le protocole 4. Ce protocole, nommé protocole 5, est présenté dans le tableau 3.19.

Tableau 3.19. Protocole d'extraction en phase solide appliqué aux MIP et NIP pour l'extraction du phosmet de l'huile d'olive en flux inversé (protocole 5).

Étape	Composition du mélange	Volume (mL)
Conditionnement	Acétate d'éthyle	6
	Ethanol	6
	Hexane	6
Dépôt	Phosmet 10^{-6} M ou 10^{-5} M préparé dans l'hexane.	4,5
Lavage	Hexane /éthanol (90:10).	4,5
Eluion	Acétate d'éthyle.	4,5

Chapitre 3 : Résultats et discussion

La figure 3.28 présente les taux de récupération de phosmet obtenus en fonction de la concentration déposée. Les résultats montrent que le pourcentage de recouvrement est supérieur à $80 \pm 10\%$ sur MIP, quelle que soit la quantité de phosmet déposée.

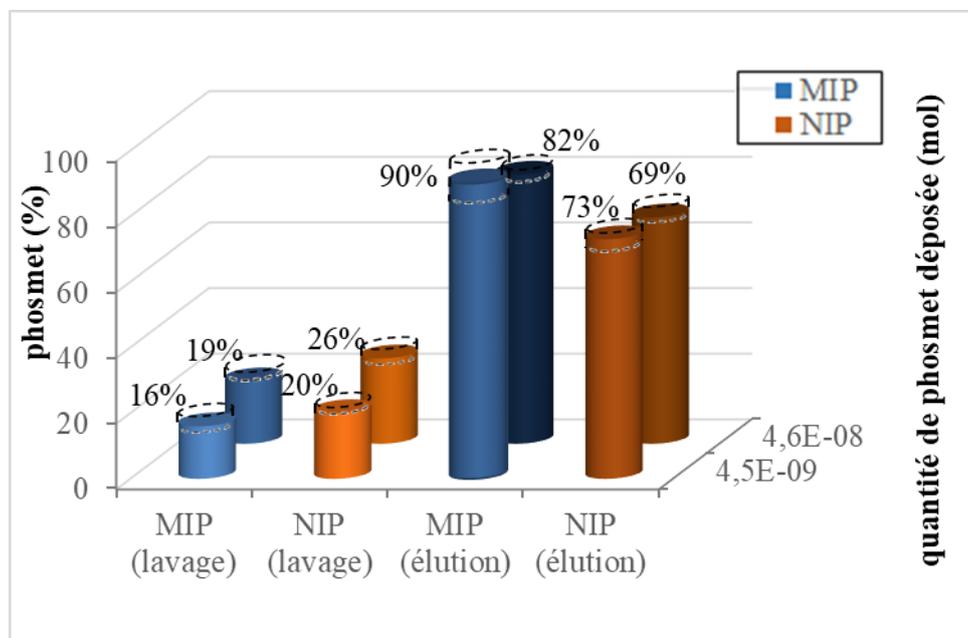


Figure 3.28. Taux de recouvrement obtenus lors de l'extraction du mélange du phosmet sur MISPE en flux inverse selon le protocole 5 (dépôt de 10 mL de phosmet à 10^{-6} M et 10^{-7} M) (n=3).

3.3.2. Comparaison de l'extraction du phosmet en configuration normale et en flux inverse

Le protocole 5 a d'abord été appliqué pour extraire le phosmet par MISPE sur colonne classique, c'est à dire en flux descendant. Les résultats obtenus ont montré peu de différence entre MIP et NIP dans toutes les étapes d'extraction.

Pour cela, les résultats d'extraction du phosmet en configuration normale en utilisant le protocole 4, et en flux inverse en utilisant le protocole 5 ont été comparés :

- Les taux de recouvrement du phosmet sur MIP lors de l'étape d'élution en utilisant les deux méthodes (configuration normale et en flux inverse) sont supérieurs à 80%.
- En flux inverse, le taux de recouvrement est de 82% pour une quantité de phosmet déposée de $4,6 \cdot 10^{-8}$ mol, alors qu'en flux normal ce taux est inférieur à 80% pour une quantité de phosmet déposée plus faible, de $1,1 \cdot 10^{-8}$ mol.

Chapitre 3 : Résultats et discussion

Ces différences peuvent s'expliquer par une meilleure cinétique d'interactions et une plus grande surface d'échange entre le phosmet et le polymère, favorisant la rétention sélective de ce dernier :

- Dans le cas de la colonne classique (en flux descendant), les échanges entre le polymère et le phosmet ne sont pas optimisés (Limousin *et al.*, 2007). Cela conduit à favoriser l'adsorption non spécifique du phosmet à la surface du polymère.
- Dans le cas de l'utilisation en flux inverse, le solvant de dépôt est l'hexane. Ce solvant permet un échange optimum entre l'hexane et le polymère. Cela conduit à faciliter le phosmet à entrer dans les cavités spécifiques imprimées dans le MIP.

Il est important de noter qu'un autre avantage de l'extraction en flux inverse réside dans la possibilité de faire circuler un grand volume de solvant, ce qui permet d'extraire et de quantifier le phosmet même lorsqu'il est présent à faible concentration (inférieure à 0,07 μM).

3.3.3. Extraction du phosmet de l'huile d'olive en flux inverse

Le dosage du phosmet contenu dans l'huile d'olive est habituellement réalisé par analyse HPLC après une extraction liquide-liquide à l'acétonitrile. Toutefois cette méthode présente certains inconvénients, notamment une surestimation du taux de phosmet, probablement lié à un effet de matrice dû aux matières grasses de l'huile (Amvrazi & Albanis, 2006). Nous avons dans un premier temps utilisé cette méthode et nous avons effectivement obtenu un rendement d'extraction du phosmet de $119 \pm 1,9\%$.

Nous avons donc ensuite utilisé le protocole 5 pour extraire sélectivement le phosmet de l'huile d'olive. Nous avons travaillé à partir de 1 g d'échantillon d'huile d'olive dopée à 3 ppm de phosmet (3 mg.L^{-1} , soit 1.10^{-5}M) et dilué dans 10 mL d'hexane. 4 mL de ce mélange ont ensuite été percolés en flux inverse.

Chapitre 3 : Résultats et discussion

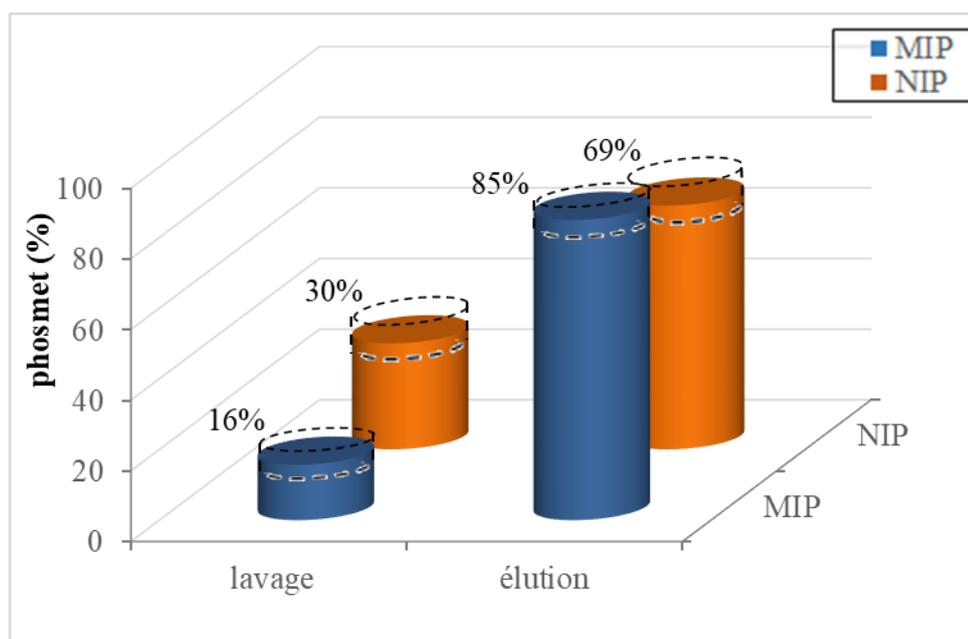


Figure 3.29. Taux de recouvrement obtenus pour les étapes de lavage et d'élution lors de l'extraction du phosmet de l'huile d'olive sur MISPE selon le protocole 5 (n=3).

La figure 3.29 présente les taux de recouvrement obtenus lors des étapes de lavage et d'élution du phosmet sur MIP et NIP (n=3). Les résultats obtenus montrent que le recouvrement obtenu lors de l'étape d'élution est de $85 \pm 1,6\%$. Ce résultat est en accord avec les taux de recouvrements obtenus pour une solution standard de phosmet préparée dans l'hexane (protocole 5, Fig. 3.28).

Références chapitre 3 : Résultats et discussion

- Aftim, N., Istamboulié, G., Piletska, E., Piletsky, S., Calas-Blanchard, C. & Noguier, T. (2017). Biosensor-assisted selection of optimal parameters for designing molecularly imprinted polymers selective to phosmet insecticide. *Talanta*, 174, pp 414–419.
- Amvrazi, E. G. & Albanis, T. A. (2006). Multiresidue Method for Determination of 35 Pesticides in Virgin Olive Oil by Using Liquid – Liquid Extraction Techniques Coupled with Solid-Phase Extraction Clean Up and Gas Chromatography with Nitrogen Phosphorus Detection and Electron Capture Detection. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54, pp 9642–9651.
- Bakas, I. (2012). theses.fr – Idriss Bakas , Modélisation moléculaire et synthèse de polymères à empreintes moléculaires pour l'extraction sélective sur phase solide d'insecticides organophosphorés à partir d'échantillons naturels : application à l'huile d'olive. Diss. perpignan-france: Via Domitia Perpignan-France & Ibn Zohr d'Agadir.
- Bayle Alpin, M.-L. (2008). theses.fr – Marie-Laure Bayle Alpin , Effet de l'exercice sur les concentrations d'androgènes chez la jeune femme : analyse de traces dans les urines : mise au point d'une phase d'extraction à base d'empreinte moléculaire.
- Bazrafshan, A. A., Ghaedi, M., Rafiee, Z., Hajati, S. & Ostovan, A. (2017). Nano-sized molecularly imprinted polymer for selective ultrasound-assisted microextraction of pesticide Carbaryl from water samples: Spectrophotometric determination. *Journal of Colloid and Interface Science*, 498, pp 313–322.
- Binsalom, A., Chianella, I., Campbell, K. & Zourob, M. (2016). Development of Solid-Phase Extraction Using Molecularly Imprinted Polymer for the Analysis of Organophosphorus Pesticides-(Chlorpyrifos) in Aqueous Solution. *Journal of Chromatography & Separation Techniques*, 07(06), pp 2–6.
- Bitar, M., Bou-Maroun, E., Lerbret, A., Ouaini, N. & Cayot, P. (2015a). Binding characteristics of molecularly imprinted polymers based on fungicides in hydroalcoholic media. *Journal of Separation Science*, 38(20), pp 3607–3614.
- Bitar, M., Cayot, P. & Bou-Maroun, E. (2014). Molecularly imprinted polymer solid phase extraction of fungicides from wine samples. *Analytical Methods*, 6(16), pp 6467–6472.
- Bitar, M., Maalouly, J., Chebib, H., Lerbret, A., Cayot, P. & Bou-Maroun, E. (2015b). Experimental design approach in the synthesis of molecularly imprinted polymers specific for iprodione fungicide. *Reactive and Functional Polymers*, 94, pp 17–24.
- Caro, E., Marcé, R. M., Cormack, P. A. G., Sherrington, D. C. & Borrull, F. (2004). A new molecularly imprinted polymer for the selective extraction of naproxen from urine samples by solid-phase extraction. *Journal of Chromatography B*, 813(1–2), pp 137–143.
- Chapuis, F., Pichon, V., Lanza, F., Sellergren, B. & Hennion, M. C. (2004). Retention mechanism of analytes in the solid-phase extraction process using molecularly imprinted polymers: Application to the extraction of triazines from complex matrices. *Journal of Chromatography B*, 804(1), pp 93–101.
- Chapuis, F., Pichon, V., Lanza, F., Sellergren, S. & Hennion, M. C. (2003). Optimization of the class-selective extraction of triazines from aqueous samples using a molecularly imprinted polymer by a comprehensive approach of the retention mechanism. *Journal of Chromatography A*, 999(1–2), pp 23–33.

Chapitre 3 : Résultats et discussion

- Claude, B. (2007). 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. Diss. Université d'Orléans.
- Claude, B., Morin, P., Bayouhd, S. & de Ceaurriz, J. (2008). Interest of molecularly imprinted polymers in the fight against doping. Extraction of tamoxifen and its main metabolite from urine followed by high-performance liquid chromatography with UV detection. *Journal of Chromatography A*, 1196–1197(1–2), pp 81–88.
- Dong, X., Wang, N., Wang, S., Zhang, X. & Fan, Z. (2004). Synthesis and application of molecularly imprinted polymer on selective solid-phase extraction for the determination of monosulfuron residue in soil. *Journal of Chromatography A*, 1057(1–2), pp 13–19.
- Dvir, H., Silman, I., Harel, M., Rosenberry, T. L. & Sussman, J. L. (2010). Acetylcholinesterase: From 3D Structure to Function. *Chem Biol Interact*, 187(1–3), pp 10–22.
- Edelbach, D. J. & Lodge, K. B. (2000). Insights into the measurement of the octanol–water partition coefficient from experiments with acrylate esters. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2(8), pp 1763–1771.
- Feng, Q., Zhao, L. & Lin, J.-M. (2009). Molecularly imprinted polymer as micro-solid phase extraction combined with high performance liquid chromatography to determine phenolic compounds in environmental water samples. *Analytica Chimica Acta*, 650(1), pp 70–76.
- Feng, S., Hu, Y., Ma, L. & Lu, X. (2017). Development of molecularly imprinted polymers-surface-enhanced Raman spectroscopy/colorimetric dual sensor for determination of chlorpyrifos in apple juice. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 241, pp 750–757.
- Ferrer, I., Lanza, F., Tolokan, A., Horvath, V., Sellergren, B., Horvai, G. & Barceló, D. (2000). Selective trace enrichment of chlorotriazine pesticides from natural waters and sediment samples using terbuthylazine molecularly imprinted polymers. *Analytical Chemistry*, 72(16), pp 3934–3941.
- García-Fernández, M., Díaz-Álvarez, M. & Martín-Esteban, A. (2017). Molecularly imprinted magnetic nanoparticles for the micro solid-phase extraction of thiabendazole from citrus samples. *Journal of Separation Science*, pp 1–23.
- Goto, T., Amano, Y., Machida, M. & Imazeki, F. (2015). Effect of Polarity of Activated Carbon Surface, Solvent and Adsorbate on Adsorption of Aromatic Compounds from Liquid Phase. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 63(9), pp 726–730.
- He, J. feng, Zhu, Q. hong & Deng, Q. ying (2007). Investigation of imprinting parameters and their recognition nature for quinine-molecularly imprinted polymers. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 67(5), pp 1297–1305.
- Henry, N. (2012). Conception de polymères à empreintes moléculaires pour l'extraction de principes actifs de produits naturels. Diss. France: Université d'Orléans.
- Howaed, P. & Meylan, W. (1997). *Handbook of physical properties of organic chemicals*. Lewis Publishers. ISBN 978-1-56670-227-0.
- Hu, S.-G., Li, L. & He, X.-W. (2005). Solid-phase extraction of esculetin from the ash bark of Chinese traditional medicine by using molecularly imprinted polymers. *Journal of Chromatography A*, 1062(1), pp 31–37.
- Hu, Y., Li, J., Hu, Y. & Li, G. (2010). Development of selective and chemically stable coating for stir bar sorptive extraction by molecularly imprinted technique. *Talanta*, 82(2), pp 464–470.

Chapitre 3 : Résultats et discussion

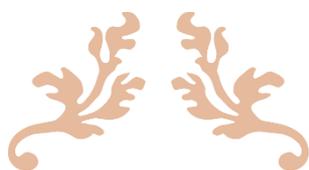
- Joshi, V. P., Kulkarni, M. G. & Mashelkar, R. A. (2000). Enhancing adsorptive separations by molecularly imprinted polymers: Role of imprinting techniques and system parameters. *Chemical Engineering Science*, 55(9), pp 1509–1522.
- Jury, W. A. & Flühler, H. (1992). *Transport of Chemicals Through Soil: Mechanisms, Models, and Field Applications*. *Advances in Agronomy*. pp 141–201.
- Kaparthi, R. & Chari, K. S. (1959). Solubilities of Vegetable Oils in Aqueous Ethanol and Ethanol-Hexane Mixtures I. *The Journal of the American Oil Chemists' Society*, 36, pp 77–80.
- Karim, K., Cowen, T., Guerreiro, A., Piletska, E., Whitcombe, M. J. & Piletsky, S. A. (2017). A Protocol for the Computational Design of High Affinity Molecularly Imprinted Polymer Synthetic Receptors. *Global Journal of Biotechnology and Biomaterial Science*, 1(3), pp 001–007.
- Kugimiya, A. & Takei, H. (2006). Preparation of molecularly imprinted polymers with thiourea group for phosphate. *Analytica Chimica Acta*, 564(2), pp 179–183.
- Kugimiya, A. & Takei, H. (2008). Selectivity and recovery performance of phosphate-selective molecularly imprinted polymer. *Analytica Chimica Acta*, 606(2), pp 252–256.
- Limousin, G., Gaudet, J.-P., Charlet, L., Szenknect, S., Barthès, V. & Krimissa, M. (2007). Sorption isotherms: A review on physical bases, modeling and measurement. *Applied Geochemistry*, 22(2), pp 249–275.
- Lv, Y., Lin, Z., Tan, T., Feng, W., Qin, P. & Li, C. (2008). Application of molecular dynamics modeling for the prediction of selective adsorption properties of dimethoate imprinting polymer. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 133(1), pp 15–23.
- Martín-Esteban, A., Turiel, E. & Stevenson, D. (2001). Effect of template size on the selectivity of molecularly imprinted polymers for phenylurea herbicides. *Chromatographia*, 53(S1), pp 434–437.
- Moller, K., Nilsson, U. & Crescenzi, C. (2001). Synthesis and evaluation of molecularly imprinted polymers for extracting hydrolysis products of organophosphate flame retardants. *Journal of Chromatography A*, 938, pp 121–130.
- Le Moullec, S., Bégos, A., Pichon, V. & Bellier, B. (2006). Selective extraction of organophosphorus nerve agent degradation products by molecularly imprinted solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A*, 1108(1), pp 7–13.
- Peng, Y., Xie, Y., Luo, J., Nie, L., Chen, Y., Chen, L., Du, S. & Zhang, Z. (2010). Molecularly imprinted polymer layer-coated silica nanoparticles toward dispersive solid-phase extraction of trace sulfonylurea herbicides from soil and crop samples. *Analytica Chimica Acta*, 674(2), pp 190–200 Elsevier B.V.
- Pereira, L. A. & Rath, S. (2009). Molecularly imprinted solid-phase extraction for the determination of fenitrothion in tomatoes. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 393(3), pp 1063–1072.
- Pichon, V. (2007). Selective sample treatment using molecularly imprinted polymers. *Journal of Chromatography A*, 1152(1–2), pp 41–53.
- Pichon, V. & Chapuis-Hugon, F. (2008). Role of molecularly imprinted polymers for selective determination of environmental pollutants—A review. *Analytica Chimica Acta*, 622(1–2), pp 48–61.

Chapitre 3 : Résultats et discussion

- Piletska, E. V., Romero-Guerra, M., Chianella, I., Karim, K., Turner, A. P. F. & Piletsky, S. A. (2005). Towards the development of multisensor for drugs of abuse based on molecularly imprinted polymers. *Analytica Chimica Acta*, 542, pp 111–117.
- Piletsky, S. a., Karim, K., Piletska, E. V., Turner, a. P. F., Day, C. J., Freebairn, K. W. & Legge, C. (2001). Recognition of ephedrine enantiomers by molecularly imprinted polymers designed using a computational approach. *The Analyst*, 126(10), pp 1826–1830.
- Rampey, A. M., Umpleby, R. J., Rushton, G. T., Iseman, J. C., Shah, R. N. & Shimizu, K. D. (2004). Characterization of the Imprint Effect and the Influence of Imprinting Conditions on Affinity, Capacity, and Heterogeneity in Molecularly Imprinted Polymers Using the Freundlich Isotherm-Affinity Distribution Analysis. *Analytical Chemistry*, 76(4), pp 1123–1133.
- Sellergren, B. (1999). Polymer- and template-related factors influencing the efficiency in molecularly imprinted solid-phase extractions. *analytical chemistry*, 18(3), pp 164–174.
- Sellergren, B. & Shea, K. J. (1993). Influence of polymer morphology on the ability of imprinted network polymers to resolve enantiomers. *Journal of Chromatography A*, 635(1), pp 31–49.
- Siadat, O. R., Lougarre, A., Lamouroux, L., Ladurantie, C. & Fournier, D. (2006). The effect of engineered disulfide bonds on the stability of *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase. *BMC Biochemistry*, 7(1), p 12.
- Song, X., Wang, J. & Zhu, J. (2009). Effect of porogenic solvent on selective performance of molecularly imprinted polymer for quercetin. *Materials Research*, 12(3), pp 299–304.
- Stojan, J., Ladurantie, C., Siadat, O. R., Paquereau, L. & Fournier, D. (2008). Evidence for subdomain flexibility in *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase. *Biochemistry*, 47(20), pp 5599–5607.
- Tamayo, F. G., Casillas, J. L. & Martin-Esteban, A. (2003). Highly selective fenuron-imprinted polymer with a homogeneous binding site distribution prepared by precipitation polymerisation and its application to the clean-up of fenuron in plant samples. *Analytica Chimica Acta*, 482(2), pp 165–173.
- Theodoridis, G., Kantifes, A., Manesiotis, P., Raikos, N. & Tsoukali-Papadopoulou, H. (2003). Preparation of a molecularly imprinted polymer for the solid-phase extraction of scopolamine with hyoscyamine as a dummy template molecule. *Journal of Chromatography A*, 987(1–2), pp 103–109.
- Turiel, E., Díaz-Álvarez, M. & Martín-Esteban, A. (2016). Supported liquid membrane-protected molecularly imprinted beads for the solid phase micro-extraction of triazines from environmental waters. *Journal of Chromatography A*, 1432, pp 1–6.
- Turner, N. W., Piletska, E. V., Karim, K., Whitcombe, M., Malecha, M., Magan, N., Baggiani, C. & Piletsky, S. A. (2004). Effect of the solvent on recognition properties of molecularly imprinted polymer specific for ochratoxin A. *Biosensors and Bioelectronics*, 20(6), pp 1060–1067.
- Umpleby, R., Baxter, S. C., Rampey, A. M., Rushton, G. T., Chen, Y. & Shimizu, K. D. (2004). Characterization of the heterogeneous binding site affinity distributions in molecularly imprinted polymers. *Journal of Chromatography B*, 804(1), pp 141–149.
- Xu, Z., Fang, G. & Wang, S. (2010). Molecularly imprinted solid phase extraction coupled to high-performance liquid chromatography for determination of trace dichlorvos residues in vegetables. *Food Chemistry*, 119(2), pp 845–850.

Chapitre 3 : Résultats et discussion

- Yilmaz, H. & Basan, H. (2015a). Development of a molecularly imprinted solid-phase extraction sorbent for the selective extraction of telmisartan from human urine. *Journal of Separation Science*, 38(8), pp 1433–1439.
- Yilmaz, H. & Basan, H. (2015b). Preconcentration of indapamide from human urine using molecularly imprinted solid-phase extraction. *Journal of Separation Science*, 38(17), pp 3090–3095.
- Yoshizako, K., Hosoya, K., Iwakoshi, Y., Kimata, K. & Tanaka, N. (1998). Porogen Imprinting Effects. *Analytical Chemistry*, 70(2), pp 386–389.



Conclusion générale



Conclusion générale

Nous avons développé dans cette thèse de doctorat des polymères à empreinte moléculaire (MIPs) pour l'extraction sélective du phosmet de la matrice huile d'olive. Une méthode originale a été proposée afin d'étudier les interactions non-covalentes entre la molécule cible (phosmet) et différents monomères fonctionnels en présence de plusieurs solvants porogènes. Le phosmet étant un inhibiteur irréversible de l'acétylcholinestérase (AChE), la méthode mise au point est fondée sur la neutralisation de l'effet inhibiteur du phosmet lorsqu'il est associé à un monomère fonctionnel. Afin de mesurer ces interactions, un biocapteur ampérométrique à AChE développé au laboratoire BAE-LBBM a été utilisé. Les interactions phosmet/monomère fonctionnel ont été étudiées lorsque ces derniers sont utilisés aux ratios molaires 1:4 et 1:8. Les résultats ont montré que le MBAA et le DMSO sont respectivement les meilleurs monomères fonctionnels et solvants porogènes, en utilisant un ratio molaire phosmet/MBAA de 1:4 et un temps de pré-polymérisation de 30 minutes. La méthode de sélection des monomères fonctionnels par biocapteur enzymatique décrite pour la première fois dans cette thèse ouvre la voie à d'autres études impliquant des molécules cibles qui seraient de potentiels substrats ou inhibiteurs enzymatiques.

Les conditions de polymérisation ont ensuite été étudiées en batch. La quantité d'initiateur, le volume de solvant porogène, la température de polymérisation ont été successivement optimisés. L'influence de la nature de l'agent de réticulation a également été étudiée, montrant que l'EGDMA était le meilleur candidat pour la synthèse de MIPs sélectifs du phosmet.

Le traitement mathématique des courbes d'adsorption selon les modèles de Langmuir et 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 le phosmet. Cette étude a été réalisée pour les polymères imprimés (MIPs) et non imprimés (NIPs) en utilisant trois agents réticulants différents : l'EGDMA, le DVB et le TMPTA. Il a été montré que le plus grand nombre de sites d'affinité et la plus grande hétérogénéité ont été obtenus en utilisant avec l'EGDMA comme agent de réticulation.

Des protocoles d'extraction par MIP en phase solide (MISPE) ont ensuite été élaborés pour l'extraction sélective du phosmet de l'huile d'olive. Après optimisation des conditions de dépôt, de lavage et d'élution, une étude de sélectivité a été menée en utilisant comme potentiel

Chapitre 3 : Résultats et discussion

interférant un autre insecticide organophosphoré : le diméthoate. Les taux de recouvrement obtenus ont été respectivement de 80% pour le phosmet et 30% pour le diméthoate montrant une relative sélectivité du polymère développé.

Le protocole d'extraction optimisé a ensuite été comparé à un mode d'extraction en flux inversé faisant intervenir une colonne alimentée par une pompe à seringue. Ce dispositif a été mis au point afin d'obtenir un meilleur rendement d'extraction du phosmet.

Enfin, l'extraction du phosmet dans l'huile d'olive a été réalisée après une simple dilution dans l'hexane (1g/10 mL). Des pourcentages de recouvrement supérieurs à 84% ont été obtenus sur le MIP en utilisant la méthode en flux inverse.

A l'avenir, nous allons tenter d'appliquer le MIP développé pour le phosmet au développement d'un capteur électrochimique à détection de spectroscopie d'impédance électrochimique.

Cette thèse ouvre donc à voie à la recherche de nouveaux réactifs dans la « pré-polymérisation » de MIPs sélectifs pour d'autres molécules cibles. La méthode innovante adoptée dans cette thèse s'avère une méthode facile à reconduire, économique et ne demandant pas d'importants moyens de préparation.

Publication

Biosensor-assisted selection of optimal parameters for designing molecularly imprinted polymers selective to phosmet insecticide

Nadin Aftim, Georges Istamboulié, Elena Piletska, Sergey Piletsky, Carole Calas- Blanchard,
Thierry Nogue

Publiée dans talanta 2017, 174, 414-419

Résumé

L'objectif de cette thèse a consisté en la synthèse d'un polymère à empreinte moléculaire (MIP) permettant l'extraction du phosmet, un pesticide organophosphoré largement utilisé en oléiculture. La recherche du monomère fonctionnel (MF) disposant de la meilleure capacité à interagir de manière non-covalente avec le phosmet en présence du solvant porogène le plus approprié a été réalisée pour la toute première fois au moyen d'un capteur à acétylcholinestérase. Cette stratégie innovante a permis une meilleure compréhension des mécanismes cinétiques à l'œuvre lors de l'interaction MF-molécule cible. De par l'importance de son rôle dans la détermination de la structure d'un MIP, le choix d'un agent réticulant aux caractéristiques physico-chimiques adéquates a permis de sélectionner le meilleur MIP en s'appuyant sur l'étude des isothermes d'adsorption selon les modèles de Freundlich et Langmuir. La procédure d'extraction du phosmet selon la procédure MISPE (*Molecularly Imprinted Solid Phase Extraction*) a été effectuée par le biais d'une cartouche SPE dont la capacité a été évaluée à partir d'une solution standard. La validation du choix des réactifs de MIP sélectionnés a été confortée par la réalisation d'une expérience de réactivité croisée appliquée à une molécule analogue au phosmet. L'extraction du phosmet de l'huile d'olive a pu être effectuée avec succès selon un protocole d'extraction en flux inverse optimisé. Cette étude ouvre ainsi la voie à la recherche de nouvelles interactions MFs-molécules cibles au moyen de biocapteurs enzymatiques inhibant des composés toxiques tels que les herbicides, fongicides et autres pesticides.

Mots clés : Polymères à empreinte moléculaire, Phosmet, Monomère fonctionnel, Biocapteur, Isothermes de Freundlich et Langmuir, Extraction en phase solide, Huile d'olive.

Abstract

The objective of this thesis has been the synthesis of a molecularly imprinted polymer (MIP) for the extraction of phosmet, an organophosphorus pesticide widely used in olive growing. The search for the functional monomer (FM) having the best ability to interact non-covalently with phosmet in the presence of the most suitable pore-forming solvent was carried out for the first time by means of an acetylcholinesterase sensor. This innovative strategy allowed us to better understand the kinetic mechanisms of FM-template interaction. Because of the importance of its role in determining the structure of a MIP, the selection of a crosslinking agent with adequate physicochemical characteristics made it possible to select the best MIP, whose adsorption isotherms were studied according to Freundlich and Langmuir models. Extraction of phosmet using a Molecularly Imprinted Solid Phase Extraction (MISPE) procedure was carried out via an SPE cartridge, whose capacity was evaluated from a standard solution. The choice of reagents and experimental conditions were validated by carrying out selectivity assays using another organophosphorus insecticide. Extraction of phosmet from olive oil was successfully carried out according to an optimized reverse flow extraction protocol. This work opens new opportunities for studying new FM-template interactions by means of enzymatic biosensors capable of detecting other inhibitors such as herbicides, fungicides and other pesticides.

Keyword: Molecularly-Imprinted Polymer (MIP), Phosmet, Functional Monomer, Freundlich and Langmuir Isotherms, Solid Phase Extraction, Olive oil.